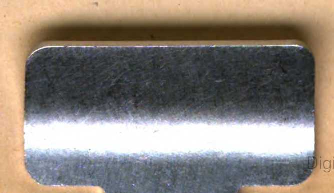


IN MEMORIAM

Richard M. Holman





~~Dr. von Heygendorff~~
~~Oberleutnant~~ z. D.

Richard M. Holman

3.00

Holman – June 21, 1913
From Mother

DIE

BOTANISCHE MIKROTECHNIK.

EIN HANDBUCH

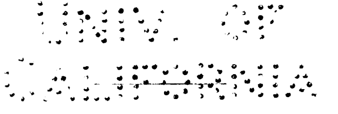
DER

MIKROSKOPISCHEN PRÄPARATIONS-, REAKTIONS- UND TINKTIONSMETHODEN

VON

Dr. A. ZIMMERMANN,

PRIVAT-DOZENTEN AN DER UNIVERSITÄT ZU TÜBINGEN.



MIT 63 ABBILDUNGEN IM TEXT.

TÜBINGEN, 1892.

VERLAG DER H. LAUPP'SCHEN BUCHHANDLUNG.

DRUCK VON H. LAUPP JR. IN TÜBINGEN.

Vorrede.

Die in dem vorliegenden Buche zusammengestellten Methoden sind zwar naturgemäss in erster Linie der in den verschiedensten Originalarbeiten und Lehrbüchern zerstreuten Litteratur entnommen. Ausserdem hat sich Verf. aber auch stets bemüht, soweit als möglich, über die angeführten Methoden durch eigene Anschauung ein Urteil zu erlangen, und so beruhen denn auch viele von den in diesem Buche enthaltenen Zahlenangaben und Abänderungen der bisher üblichen Methoden auf eigenen Untersuchungen des Verfassers.

Trotzdem wird jedoch an allen Stellen die benutzte Litteratur möglichst vollständig angeführt, soweit dieselbe auch jetzt noch irgendwie verwertbar erschien. Werke, die nur ein historisches Interesse haben, sind dagegen in diesem für die Praxis berechneten Buche unberücksichtigt gelassen.

Wenn Verf. übrigens manche Angabe, die noch jetzt mit Nutzen zu verwerten gewesen wäre, übersehen hat, so wird dies hoffentlich ein Jeder, der den immensen Umfang, den die botanische Litteratur namentlich in den letzten Jahren angenommen hat, kennt, begreiflich und verzeihlich finden. Verf. wird einem Jeden, der ihn auf diesbezügliche Mängel aufmerksam machen wollte, dankbar sein.

Hinsichtlich der Litteraturangaben sei noch bemerkt, dass im Text dieses Buches hinter die Autornamen Zahlen gesetzt sind, die sich auf das p. 253 befindliche Litteraturverzeichnis beziehen, und zwar zeigt die erste (römische) Zahl die betreffende Arbeit, die zweite eventuell die Seitenzahl des Citates an. Waren dem Verf. bei Abfassung seiner Arbeit die betreffenden Originalarbeiten nicht zugänglich, so sind in dem Litteraturverzeichnis die benutzten Referate angeführt.

In der Anordnung der organischen Verbindungen ist Verf. im wesentlichen dem Handbuch der organischen Chemie von Beilstein (II. Auflage, Leipzig, 1886—1890) gefolgt.

Die Abbildungen sind, falls nicht das Gegenteil ausdrücklich bemerkt ist, nach Originalzeichnungen des Verf. angefertigt.

Das Manuskript war im wesentlichen im Juli 1891 abgeschlossen; doch habe ich mich bemüht, auch die neuere Litteratur, soweit als möglich, während des Druckes noch zu berücksichtigen.

Tübingen, März 1892.

Inhaltsverzeichnis.

I. Abteilung. Allgemeine Methodik.

II. Abteilung. Mikrochemie.

A. Anorganische Verbindungen.

B. Organische Verbindungen.

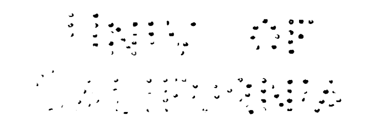
I. Fettreihe.

II. Aromatische Reihe.

III. Abteilung. Untersuchungsmethoden für die Zellmembran und die verschiedenen Einschlüsse und Differenzierungen des Plasmakörpers.

A. Die Zellmembran.

B. Der Plasmakörper und Zellsaft.



I. Abteilung.

Allgemeine Methodik.

1. Die Beobachtung lebender Pflanzen und Pflanzenteile.

§ 1. Die direkte Beobachtung *mikroskopisch kleiner Algen und Pilze* bietet im allgemeinen keine Schwierigkeiten und geschieht am zweckmässigsten in der Kulturflüssigkeit der betreffenden Organismen.

Bei zarten Objekten, die durch den *Druck des Deckglases* leiden würden, kann man dies durch Unterlegen von Papierstreifen, Glasröhrchen oder dergl. verhindern. Sehr geeignet ist zu diesem Zwecke auch die von Kirchner (I, VII) und Vosseler (I, 461) vorgeschlagene Methode, nach der das Deckglas auf den 4 Ecken mit kleinen »*Wachsfüsschen*« versehen wird, zu denen man am besten eine Mischung aus Wachs und Terpentin benutzt. Diese wird in der Weise dargestellt, dass man in erhitztes Wachs etwa $^1/_2$ oder $^1/_3$ soviel venetianisches Terpentin unter beständigem Umrühren einträgt. Diese Masse haftet sehr fest an Glas und besitzt dennoch eine gewisse Plasticität, so dass man auf der einen Seite sehr gut mit Immersion beobachten, auf der andern Seite das Deckglas aber noch beliebig verschieben oder senken kann.

§ 2. Handelt es sich um Untersuchungen, die über einen *grösseren Zeitraum* ausgedehnt werden sollen, wird in den meisten Fällen durch das Bedecken der in einen kleinen Flüssigkeitstropfen eingeschlossenen Organismen mit einem Deckglase der *Sauerstoffzutritt* allzusehr erschwert. Man bedient sich in solchen Fällen gewöhnlich einer sogenannten *feuchten Kammer*, die nach oben mit einem Deckgläschen abgeschlossen ist, von dessen Unterseite ein Tropfen von der die betreffenden Mikroorganismen enthaltenden Kulturflüssigkeit frei hinabhängt (*Beobachtung im hängenden Tropfen*).

Eine derartige feuchte Kammer kann man sich am einfachsten aus c. 2 mm dicker Pappe herstellen. Aus dieser schneidet man sich zunächst ein rechteckiges Stück, das wenig kleiner ist als die zu benutzenden Objektträger und bringt dann in der Mitte desselben eine quadratische Oeffnung an, deren Seiten etwa 4 mm kürzer sind, als die des anzuwendenden Deckgläschens (cf. Fig. 1, a). Diese Papprahmen werden vor der Benutzung in kochendes Wasser geworfen, worin sich dieselben mit Wasser durchtränken und gleichzeitig sterilisiert werden. Im noch feuchten Zustande werden sie dann auf einen Objektträger gebracht und dann das die zu kultivierenden Organismen auf seiner Unterseite im hängenden Tropfen enthaltende Deckglas derartig darauf gelegt, dass der Rand des Deckgläschens allseitig auf dem Papprahmen ruht, wie Fig. 1 b zeigt, die eine solche feuchte Kammer im Längsschnitt darstellt.

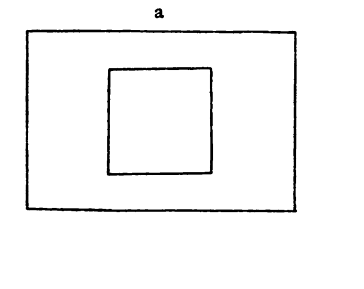




Fig. 1. Feuchte Kammer zur Kultur von Mikroorganismen.

Der Kulturtropfen steht so offenbar mit einem grossen Luftvolumen in Verbindung und ist ausserdem vor Verdunstung geschützt, wenn man nur den Papprahmen, dadurch dass man von Zeit zu Zeit einige Wassertropfen auf denselben bringt, feucht erhält.

Ausserdem hat man noch verschiedene andere feuchte Kammern, wie z. B. ausgeschliffene Objektträger und Glasklötze mit halbkugel- oder mehr linsenförmiger Vertiefung zu dem gleichen Zwecke angewandt. Dieselben werden auch sicher in manchen Fällen gewisse Vorteile bieten; im allgemeinen beruhen sie aber sämtlich auf dem nämlichen Prinzip und sind in ihrer Anwendung leicht verständlich (cf. Strasburger I, 415 ff. und Behrens I, 51 und 162).

Uebrigens ist es bei allen diesen feuchten Kammern in den meisten Fällen notwendig, die Kulturflüssigkeit von Zeit zu Zeit, etwa 2mal täglich, zu erneuern. Bei einigermassen grossen Objekten kann dies ja auch leicht in der Weise geschehen, dass man den Tropfen mit Fliesspapier aufsaugt und dann einen neuen Tropfen auf das betreffende Deckglas bringt.

§ 3. In manchen Fällen wird man sich aber auch mit gutem Erfolg der neuerdings von verschiedenen Seiten empfohlenen Kulturmethoden bedienen können, bei denen *ein kontinuierlicher Wechsel der Kulturflüssigkeit* stattfindet. Ich will hier nur die von af Klercker (II) beschriebene Methode ausführlicher besprechen, die den von Rhumbler (I) und Schönfeld (I) beschriebenen Methoden gegenüber entschieden gewisse Vorteile zu besitzen scheint.

J. af Klercker benutzt zunächst einen englischen Objektträger (cf. Fig. 2) auf dem die beiden c. 0,14 dicken Glasleisten L in der aus der Figur ersichtlichen Weise mit Canadabalsam

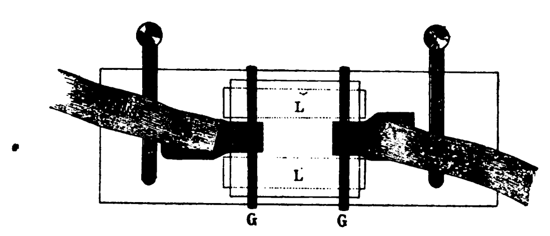


Fig. 2. Objektträger zur Kultur in fliessendem Wasser. Nach J. af Klercker.

festgeklebt sind. In die Mitte der so entstandenen Rinne wird dann der zu kultivierende Organismus gebracht, sodann ein grosses Deckgläschen darauf gelegt und wenn der so entstandene kapillare Raum zwischen dem Objektträger, den beiden Glasleisten und dem Deckgläschen noch nicht ganz mit Flüssigkeit erfüllt ist, eine ausreichende Menge von der betreffenden Kulturflüssigkeit zugesetzt. Sodann wird auf jeder Seite ein Leinwandstreifen (S Fig. 2) unter das Deckglas geschoben und dieses mit den Kautschukringen G auf dem Objektträger festgeklemmt. Der so beschickte Objektträger wird sodann, um ein leichteres Verschieben zu ermöglichen mit Wachs auf einem zweiten Objektträger festgeklebt und dann das Ganze in der aus Fig. 3 ersichtlichen Weise auf dem Objekttische des Mikroskops mit 2 Klemmen befestigt.

Der Zufluss des Wassers geschieht sodann durch den Heber H (Fig. 3) aus dem grossen mit einer Glasplatte vor Staub zu schützenden Becherglase (B_I) mit Hilfe eines in dasselbe geschobenen Leinwandstreifens (S_I), dessen freies Ende auf den Leinwandstreifen S Fig. 2 gelegt wird. Der Abfluss wird in gleicher Weise durch einen Leinwandstreifen (S_{II}) der mit dem kleinen

Becherglase (BII) in Verbindung steht, bewirkt. Die Stromgeschwindigkeit lässt sich natürlich sowohl durch Aenderung des

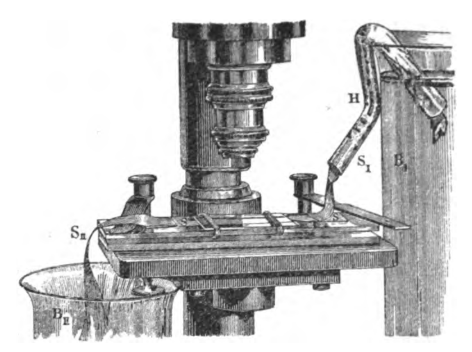


Fig. 3. Teil des Mikroskops mit dem Apparate zur Kultur in fliessendem Wasser. Nach J. af Klercker.

Wasserspiegels in dem Becherglase BI, als auch durch festeres oder loseres Einzwengen des Leinwandstreifens in dem Heber H regulieren. J. af Klercker lässt gewöhnlich in 24 Stunden ca. 50 ccm Flüssigkeit durchströmen.

§ 4. Um bei längerer Zeit andauernder Kultur von Algen *Bakterien und andere Pilze fernzuhalten,* setzt man nach Klebs (III, 492) der Kulturflüssigkeit zweckmässig 0,05 % neutrales Kaliumchromat (CrO_4K_2) zu, das den Algen — und ebenso auch Schnitten von höheren Gewächsen — keinen nachweisbaren Schaden zufügt. Von Palla (I, 322) wurde zu dem gleichen Zwecke auch ein Zusatz von 0,01 % Kaliumbichromat ($Cr_2O_7K_2$) verwandt.

§ 5. Handelt es sich darum *Schnitte von grösseren Pflanzenteilen* im lebenden Zustande zu beobachten, so müssen dieselben natürlich stets dicker als eine Zellschicht sein, damit sie Zellen, die durch das Schneiden in keiner Weise verletzt sind, enthalten. Die meisten Zellen sterben jedoch trotzdem in reinem Wasser ziemlich schnell ab, wobei namentlich die Chromatophoren und der Zellkern häufig unter starker Verquellung vollständig deformiert werden.

Es wurden deshalb sehr verschiedene Einschlussflüssigkeiten zur Beobachtung lebender Zellen angewandt, so namentlich verschiedene neutrale *Salzlösungen,* 2—10 % *Zuckerlösung, Gummi arabicum* und frisches *Eiweiss.* Bei der Untersuchung der Kernteilungen in den Embryosäcken leistete Treub (I, 9) namentlich 1,4% Kalisalpeterlösung gute Dienste.

Die Beobachtung der unversehrten Chromotophoren geschieht, wie Bredow (I) angegeben und Verf. nur bestätigen kann, in vielen Fällen sehr zweckmässig in der Weise, dass man die frischen Schnitte direkt in *Oel* (etwa frisches Olivenöl) bringt. Die Zellen bleiben in diesem nicht nur lange Zeit am Leben, sondern es wirkt 'das Oel gleichzeitig infolge seiner starken Lichtbrechung aufhellend und verdrängt ausserdem die Luft aus den Intercellularen meist ziemlich vollständig.

Bei Anwendung der anderen Beobachtungsflüssigkeiten wird man sich dagegen in den meisten Fällen zur *Entfernung der Luft* einer *Wasserstrahlpumpe* bedienen, und zwar kann man sowohl die Schnitte auf dem Objektträger auspumpen, als auch grössere Stücke von dem betreffenden Objekte vor dem Schneiden mit der betreffenden Flüssigkeit injicieren. Diese bringt man dann zweckmässig in kleine Krystallisierschalen und klemmt sie event. noch durch aufgelegte Fliesspapierstücke derartig am Boden des Gefässes fest, dass sie auch während des Auspumpens völlig untergetaucht bleiben.

Den gleichen Zweck kann man übrigens auch dadurch erreichen, dass man die lufthaltigen Schnitte in *ausgekochtes Wasser* bringt; doch dürfte wohl im allgemeinen die Luftpumpe schneller zum Ziele führen.

2. Die Untersuchung getrockneter Pflanzen.

§ 6. Zur Untersuchung *getrockneter Algen und Pilze* empfiehlt von Lagerheim (I u. II), dieselben zunächst in Wasser aufzuweichen und dann in konzentrierte *Milchsäure* zu übertragen, in der sie so lange erhitzt werden, bis sich kleine Blasen zeigen. Die betreffenden Organismen, die wieder vollständig ihre ursprüngliche Form angenommen haben, können dann direkt in der Milchsäurelösung untersucht werden.

§ 7. *Herbarmaterial von höheren Gewächsen* wird man vielfach einfach dadurch, dass man es in Wasser aufweicht, schnittfähig machen können. In vielen Fällen wird man die getrockneten Pflanzenteile vorher mit verdünnter Ammoniaklösung oder Kalilauge behandeln, die man vor dem Schneiden durch Auswaschen wieder entfernt. Die Konzentration der Lösungen und die Dauer der Einwirkung richtet sich natürlich ganz nach der Natur der betreffenden Objekte und ist in jedem einzelnen Falle auszupro-

bieren. Kleine oder bröckelige Objekte wird man wohl vielfach am zweckmässigsten nach der Einbettung in Paraffin oder dergl. mit dem Mikrotom schneiden (vergl. § 41 u. ff.). Objekte, die sich beim Trocknen stark gefärbt haben, wird man wohl am besten durch *Eau de Javelle* entfärben (vergl. § 12, 4).

3. Die Mazeration.

§ 8. In vielen Fällen, namentlich wenn es sich um die Grösse, Gestalt oder Membranstruktur der verschiedenen Zellen handelt, ist es wünschenswert, ein Organ in seine einzelnen Zellen zu zergliedern. Dieser Vorgang, den man gewöhnlich als *Mazeration* bezeichnet, beruht darauf, dass die zwischen den aneinanderstossenden Zellen vorhandene Mittellamelle durch verschiedene Reagentien in Lösung übergeführt wird, so dass sich die einzelnen Zellen von einander *isolieren*. Die leichte Löslichkeit der Mittellamelle beruht nun nach den Untersuchungen von Mangin (IV u. VI) in den meisten Fällen darauf, dass dieselbe aus verschiedenartigen *Pectin*stoffen besteht. So kann man denn auch in der That bei sehr zahlreichen Objekten eine Isolierung der Zellen dadurch bewirken, dass man dieselben zunächst mit Säurealkohol und dann mit Ammoniak behandelt (cf. § 295).

Ausserdem kann man aber zu dem gleichen Zwecke sehr verschiedenartige andere Mittel anwenden. So genügt es in manchen Fällen schon, die betreffenden Pflanzenteile für einige Zeit in *kochendes Wasser oder verdünnte Säuren* zu bringen, um eine völlige Isolierung der einzelnen Zellen zu bewirken. Bei saftigen Früchten lassen sich ferner nach Solla (I) durch Oxalsäure oder Weinsäure, bei Kartoffeln oder Mohrrüben durch Essigsäure die einzelnen Zellen isolieren. Das Endosperm von Phytelephas soll ferner durch Chlorwasser oder Kalilauge in einigen Tagen, durch Salzsäure in zwei Minuten in die einzelnen Zellen zerlegt werden.

Im allgemeinen sind jedoch energischer wirkende Reagentien zur Isolierung der einzelnen Zellen notwendig oder führen wenigstens viel schneller und sicherer zum Ziele.

§ 9. Zu einer allgemeineren Anwendung sind nun namentlich die folgenden Mazerationsmittel geeignet.

1. *Das Schulze'sche Mazerationsgemisch* (NO_3H und ClO_3K). Dasselbe wird wohl auch jetzt noch am häufigsten zur Mazeration

benutzt. Man wendet es zweckmässig in der Weise an, dass man etwa streichholzgrosse Stücke von dem betreffenden Organe in ein ca. 2 ccm gewöhnlicher konzentrierter Salpetersäure enthaltendes Reagenzglas bringt, einige Krystalle von chlorsaurem Kali hinzuschüttet und dann das Reagenzglas erwärmt, bis lebhafte Blasenentwicklung eintritt. Man lässt dann das Reagenz noch einige Minuten einwirken, im allgemeinen bis die Stücke völlig weiss geworden sind, giesst den ganzen Inhalt des Reagenzglases in eine mit Wasser gefüllte Krystallisierschale und bringt dann direkt oder besser nach nochmaligem Auswaschen mit reinem Wasser oder auch mit Alkohol Stücke von dem mazerierten Objekte auf einen Objektträger, auf dem sie sich dann leicht mit zwei Nadeln oder dergl. in die einzelnen Zellen zerzupfen lassen.

Vielfach kann man auch die Isolierung der Zellen aus den grösseren mit der Mazerationsflüssigkeit behandelten Stücken zweckmässig durch starkes Schütteln in einem zur Hälfte mit Wasser gefülltem Gläschen erreichen.

Hervorzuheben ist noch, dass die Erhitzung des Mazerationsgemisches wegen der Entwickelung schädlicher Gase am besten unter dem Abzuge vorgenommen wird, jedenfalls aber nicht in der Nähe des Mikroskops.

2. *Chromsäure* (CrO_3). Chromsäure kann namentlich *bei Schnitten* zur Isolierung der Zellen dienen. Man bringt dieselben zweckmässig in die konzentrierte wässerige Lösung der genannten Säure und wäscht dieselbe nach ½—5 Minuten langer Einwirkung mit viel Wasser aus. Die Schnitte lassen sich dann meist leicht in die einzelnen Zellen zerzupfen. Uebrigens greift die Chromsäure bei längerer Einwirkung die Membranen viel stärker an als das Schulze'sche Mazerationsgemisch, das im allgemeinen den Vorzug verdienen dürfte, wenn auch die Handhabung desselben etwas umständlicher ist.

3. *Kalilauge.* Kalilauge leistet namentlich bei zarten Geweben, wie z. B. den Wurzeln von Taraxacum officinale, gute Dienste. Man kocht die betreffenden Pflanzenteile zweckmässig einige Minuten in einer etwa 50 % Kalihydrat enthaltenden Lösung und überträgt sie dann in Wasser. Es lassen sich dann die Zellen leicht durch Zerzupfen isolieren. Auch zur Isolierung der Korkzellen wird von Solla (I) verdünnte Kalilauge empfohlen.

4. *Glycerin und Schwefelsäure.* Nach der von A. Fischer (IV p. XCVI) vorgeschlagenen Methode ist gleichzeitig der Nach-

weis von Stärke in den isolierten Zellen möglich. Der genannte Autor bringt zu diesem Zwecke isolierte Gefässbündel oder entsprechende Schnitte in eine Lösung von Jod in Glycerin unter Deckglas, setzt an den Rand desselben einen Tropfen Schwefelsäure und erwärmt ganz kurze Zeit zum Sieden, höchstens 1 Minute lang. Durch einen Druck auf das Deckglas lässt sich dann eine vollständige Isolierung der einzelnen Zellen herbeiführen; etwa vorhandene Stärke, die durch die mit Glycerin verdünnte Schwefelsäure nicht aufgelöst wird, wird infolge der Färbung durch Jod deutlich sichtbar. Bei weichen Pflanzenteilen, Blättern, krautigen Stengeln vermag diese Methode in der That ganz ausgezeichnete Dienste zu leisten. Für Holz und dergl. fand ich dieselbe dagegen nicht geeignet.

4. Die Quellung.

§ 10. Namentlich um gewisse Strukturverhältnisse der Membranen und Stärkekörner besser hervortreten zu lassen, bedient man sich zweckmässig der sogenannten *Quellungsmittel,* die eine in erster Linie auf stärkerer Wassereinlagerung beruhende Volumzunahme der betreffenden Objekte bewirken.

Das am meisten angewandte Quellungsmittel ist wohl die wässerige *Kalilauge,* die eine je nach der Konzentration stärkere oder schwächere Quellung bewirkt. Dieselbe ist übrigens auch sehr geeignet um die Quellungserscheinungen der Proteïnkrystalloide zu studieren.

Ein starkes Quellungsmittel ist ferner auch die konzentrierte *Schwefelsäure,* die die aus reiner Cellulose bestehenden Membranen schliesslich ganz in Lösung bringt. Auch *Kupferoxydammoniak* (cf. § 246) wirkt in ähnlicher Weise.

Als Quellungsmittel für Stärkekörner wurde namentlich *Chromsäure* mehrfach empfohlen.

Von Dippel (I) wurde schliesslich auch eine Auflösung von *Quecksilberjodid* in *Jodkaliumlösung* zur Sichtbarmachung gewisser Membranstrukturen angewandt. Die passende Konzentration dieser Lösung muss für jeden speziellen Fall ausprobiert werden.

5. Die Aufhellung.

§ 11. In vielen Fällen, wo es sich weniger darum handelt, den gesamten Inhalt der verschiedenen Zellen als vielmehr die

allgemeine Anordnung derselben, den Gefässbündelverlauf oder die Verbreitung weniger löslicher Inhaltskörper der Zelle, wie z. B. Calciumoxalatkrystalle oder dergl. festzustellen, kann es erwünscht sein, grössere Gewebekomplexe möglichst durchsichtig zu machen. Zu diesem »*Aufhellen*« der Präparate wurden nun von den pflanzlichen Anatomen bisher namentlich stark lösend oder zersetzend wirkende Reagentien, wie Kalilauge, Chloralhydrat und dergl. angewandt, die hauptsächlich durch Lösung oder Verquellung der der Beobachtung hinderlichen Inhaltskörper der Zellen aufhellend wirken.

Eine grosse Rolle spielen die Aufhellungsmittel, ferner auch bei allen *gefärbten* Präparaten; bei diesen sind jedoch im allgemeinen die obengenannten Reagentien nicht anwendbar, da sie die meisten Farbstoffe zersetzen würden. In diesem Falle wird man sich fast ausschliesslich der von den Zoologen und Anatomen schon seit langer Zeit angewandten Methoden bedienen und die Präparate in stark lichtbrechende Medien wie Nelkenöl, Canadabalsam oder dergl. bringen, die weniger durch Zerstörung als durch Ausgleichung der Brechungsunterschiede aufhellen.

Man kann somit zweckmässig zwischen einer *chemischen* und einer *physikalischen Aufhellung* unterscheiden, wenn sich auch eine ganz scharfe Grenze zwischen diesen beiden Prozessen nicht ziehen lässt. Namentlich werden die in erster Linie chemisch wirksamen Reagentien vielfach auch noch ausserdem durch ihren höheren Brechungsindex aufhellend wirken können. Immerhin handelt es sich hier doch um zwei im wesentlichen verschiedene Methoden, und es scheint mir somit eine gesonderte Besprechung derselben gerechtfertigt. Ich will jedoch zuvor noch hervorheben, dass die physikalischen Aufhellungsmethoden in ihrer Anwendbarkeit keineswegs auf gefärbte Präparate beschränkt sind und namentlich auch dann, wenn es sich um Untersuchungen im polarisierten Lichte handelt, mit bestem Erfolg angewandt werden können.

A. Chemische Aufhellungsmethoden.

§ 12. Zur chemischen Aufhellung der Präparate wurde früher fast allgemein Kalilauge verwandt. In neuerer Zeit sind aber noch verschiedene andere Aufhellungsmittel, wie namentlich Phenol, Chloralhydrat und Eau de Javelle empfohlen worden, die in den meisten Fällen entschieden den Vorzug verdienen; je nach dem Zweck der Untersuchung wird man jedoch, bald das eine, bald

das andere Aufhellungsmittel mit dem besten Erfolg anwenden. Bezüglich der Anwendungsweise dieser Reagentien sei folgendes bemerkt.

1. *Kalihydrat* (KOH) wird meist in wässeriger Lösung und zwar in verschiedener Konzentration angewandt; ausserdem wurden aber auch Lösungen von Kalihydrat in Alkohol oder in verschiedenen Gemischen von Alkohol und Wasser zum Aufhellen empfohlen. Zum völligen Aufhellen bedarf es häufig mehrerer Stunden, zuweilen selbst mehrerer Tage, doch kann durch Erwärmen häufig eine Beschleunigung erzielt werden. Nach dem Absaugen der Lösung und oberflächlichem Auswaschen mit Wasser wird das freie Kali am besten durch verdünnte Salz- oder Essigsäure neutralisiert. Werden die Präparate dann zu undurchsichtig, so kann man sie auch nochmals mit Kalilauge behandeln oder auch mit Ammoniak durchsichtiger machen.

Die gut ausgewaschenen Präparate lassen sich zum grössten Teile in Glyceringelatine einige Zeit konservieren; nach einigen Jahren werden sie aber meist dunkel und häufig auch trübe.

Zur Tinktion der mit Kalilauge behandelten Präparate empfiehlt Errera (IV) *Canarin*, das durch Kalilauge nicht zersetzt wird.

2. *Phenol* (C_6H_5OH). Zur Aufhellung benutzt man am besten eine Lösung von krystallisiertem Phenol, die nur soviel Wasser enthält, um bei gewöhnlicher Temperatur flüssig zu sein. Dieselbe dringt in angeschnittene Pflanzenteile relativ schnell ein und macht sie meist in kurzer Zeit völlig durchsichtig. Diese Aufhellung lässt sich übrigens noch dadurch bedeutend beschleunigen, dass man die betreffenden Objekte in der Phenollösung zum Sieden erhitzt; es tritt so auch gleichzeitig eine vollständige Verdrängung der Luft aus dem Intercellularsystem ein.

Die mit Phenol aufgehellten Objekte können nach meinen Erfahrungen zweckmässig in dem Vosseler'schen Terpentin konserviert werden (cf. § 27).

3. *Chloralhydrat* ($CCl_3 . C H(OH)_2$). Chloralhydrat wurde bisher gewöhnlich in konzentrierter wässeriger Lösung zum Aufhellen angewandt. Dieselbe kann sowohl bei frischem als auch bei Alkoholmaterial benutzt werden. Um die Extraktion des Chlorophylls zu beschleunigen, kann man übrigens auch sehr gut eine konzentrierte alkoholische Lösung von Chloralhydrat zum Aufhellen

benutzen. Auch lässt sich die Reaktion durch Erwärmen beschleunigen.

4. *Eau de Javelle.* Als Eau de Javelle wird in der Pharmacie eine Lösung von *Kaliumhypochlorit* (ClOK) bezeichnet. Dieselbe ist in gebrauchsfähigem Zustande jederzeit aus der Apotheke zu beziehen; sie kann aber auch in der Weise bereitet werden, dass man eine konzentrierte wässerige Lösung von Chlorkalk solange mit einer Lösung von Kaliumoxalat versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Die von dem Niederschlage abfiltrierte Lösung kann event. vor dem Gebrauch noch mit Wasser verdünnt werden (cf. Strasburger I, 632).

Die Eau de Javelle wirkt ähnlich wie Chloralhydrat, hat aber den Vorzug, dass sie das Chlorophyll viel schneller zerstört. Auch kann sie bei getrockneten Pflanzenteilen sehr gut zum Entfärben benutzt werden.

B. Physikalische Aufhellungsmethoden.

§ 13. Die physikalische Aufhellung wird natürlich um so vollständiger sein, je mehr sich der Brechungsindex der Einschlussflüssigkeit demjenigen der Zellmembran oder der etwa in Betracht kommenden Inhaltsbestandteile der Zelle nähert. So wird in vielen Fällen schon *Glycerin* eine gewisse aufhellende Wirkung ausüben müssen, denn der Brechungsindex des reinen Glycerins (1,46) ist beträchtlich grösser als der des Wassers (1,33). Eine bedeutend vollständigere Aufhellung wird jedoch in den meisten Fällen durch verschiedene *ätherische Oele, Balsame* und *Harze* erreicht. Unter diesen nimmt zur Zeit der *Canada-Balsam* wohl immer noch die erste Rolle ein und wir wollen deshalb zunächst die Uebertragung in diesen ausführlich besprechen; dieselbe erfordert nämlich namentlich dann, wenn das betreffende Objekt sich in Wasser befand, eine ganze Reihe von Manipulationen.

So ist zunächst, da der Canada-Balsam in Wasser ganz unlöslich ist, eine vollständige *Entwässerung* der Präparate notwendig. Da nun diese gewöhnlich durch Alkohol bewirkt wird, mit dem der Canadabalsam sich nicht mischt, ist ausserdem noch *die Verdrängung des Alkohols* durch eine mit Canadabalsam sich mischende Flüssigkeit, wie Xylol, Nelkenöl oder dergl. erforderlich.

Nach dieser Methode, die als die normale oder gewöhnliche Uebertragungsweise aus Wasser in Canadabalsam bezeichnet werden kann, sind also stets drei verschiedene Manipulationen zu

unterscheiden: die *Entwässerung*, die *Verdrängung des Alkohols* und die *Uebertragung in das Einschlussmittel*. Wenn nun im folgenden einfach von der Uebertragung oder Aufhellung in Canadabalsam die Rede ist, so ist immer stillschweigend die Anwendung dieser dem Anfänger vielleicht etwas kompliziert erscheinenden Aufhellungsmethode vorausgesetzt. Wir werden jedoch nach Besprechung der Einzelheiten dieser Methode sehen, dass der gleiche Zweck auch noch durch verschiedene andere Methoden erreicht werden kann, deren Anwendung in verschiedenen Fällen, z. B. wenn die Natur des Tinktionsmittels die Behandlung der Präparate mit Alkohol ausschliesst, zur Notwendigkeit wird.

Schliesslich soll dann in diesem Kapitel noch die Anwendung einiger anderer stark lichtbrechender Einschlussmittel besprochen werden.

I. Die gewöhnliche Methode der Uebertragung aus Wasser in Canadabalsam.

a) Die Entwässerung.

§ 14. Die Entwässerung durch Alkohol bietet im allgemeinen nicht die geringsten Schwierigkeiten: Bei Mikrotomschnitten genügt es, dieselben mit Alkohol zu übergiessen und den Alkohol dann abfliessen zu lassen; Freihandschnitte werden am besten in kleine Schalen oder Näpfchen mit Alkohol gelegt, in dem sie eine je nach ihrer Dicke längere oder kürzere Zeit verweilen.

Bei der direkten Uebertragung aus Wasser in Alkohol tritt jedoch häufig der Uebelstand ein, dass die Zellen infolge zu schneller Wasserentziehung zusammenschrumpfen, *kollabieren*. Zur Vermeidung dieses *Kollapses* der Zellen sind verschiedene Methoden angewandt, bei denen es im wesentlichen darauf ankommt, dass die Verdrängung des Wassers durch den Alkohol ganz allmählich stattfindet.

Dies kann zunächst dadurch erreicht werden, dass man die Präparate nach einander in verschiedene Gemische von Wasser und Alkohol bringt, von denen das Folgende immer das vorhergehende an Alkoholgehalt übertrifft. So kann man z. B. den Kollaps verhindern, wenn man die Präparate zuerst in 10% Alkohol bringt und dann der Reihe nach in 30%, 50%, 70%, 90% und schliesslich in absoluten Alkohol überträgt. Die zwischen jedem Flüssigkeitswechsel einzuhaltende Zeit richtet sich natürlich nach

der Dicke der betreffenden Pflanzenteile; bei zarten Objekten, wie z. B. einzelligen Algen genügen jedenfalls stets Intervalle von wenigen Minuten.

Handelt es sich hier um Fadenalgen, so kann man sich die Uebertragung dadurch wesentlich erleichtern, dass man dieselben mit Hilfe eines Fadens zusammenbindet.

§ 15. Eine allmähliche Entwässerung kann ferner nach einer von J. af Klercker ersonnenen Methode dadurch erreicht werden, dass man den absoluten Alkohol ganz langsam durch ein feines Kapillarrohr zu dem 10% Alkohol hinzutreten lässt.

§ 16. Namentlich für kleinere Objekte sehr geeignet ist auch das von Fr. E. Schulze (I) empfohlene Entwässerungsgefäss [1]), bei dem die allmähliche Verdrängung des Wassers auf osmotischem Wege erreicht wird. Wie die beistehende Figur 4, in der nur der das Gefäss abschliessende glockenförmige Deckel nicht mit abgebildet ist, zeigt, besteht dasselbe in der Hauptsache aus zwei in einander gestellten oben erweiterten Cylindern, deren untere Oeffnung durch eine den osmotischen Austausch zwischen Wasser und Alkohol gestattende Lamelle abgeschlossen ist. *Schulze* empfiehlt zu diesem Zwecke ein dünnes Briefpapier, das als »*Postverdruss*« bezeichnet wird, dasselbe wird mit Leim auf dem unteren abgeschliffenen Rand der Cylinder geklebt.



Fig. 4. Entwässerungsgefäss nach E. Schulze.

In den inneren Cylinder werden nun die zu entwässerndenObjekte in ganz verdünntem, etwa 10% Alkohol hineingebracht, in den äusseren Cylinder kommt dagegen eine geringe Menge etwas stärkeren, etwa 50% Alkohols, und in das die beiden Cylinder aufnehmende Gefäss absoluter Alkohol, der noch durch eine auf dem Boden des Gefässes befindliche Schicht von geglühtem Kupfervitriol wasserfrei erhalten wird. Zur völligen Entwässerung sind 24 Stunden wohl stets ausreichend. Uebrigens lässt sich die Schnelligkeit des osmotischen Austausches durch Aenderung der Niveaudifferenzen der verschiedenen Flüssigkeiten wesentlich regulieren. Bei weniger empfindlichen Ob-

1) Dasselbe ist von Warmbrunn, Quilitz u. Co. Berlin C, Rosenthalerstr. 40 zum Preise von 2,75 Mark zu beziehen.

jekten kann man sich auch sehr gut mit *einem* Cylinder begnügen; dann lässt sich die Entwässerung schon in wenigen Stunden ausführen.

§ 17. Nach der von Overton (I, 12) vorgeschlagenen Methode lässt sich die Entwässerung endlich auch in der Weise ausführen, dass man die betreffenden Objekte zunächst in 10% Glycerin überträgt, in diesem erleiden fixierte Objekte niemals Kollaps, lebende tödtet man zuvor zweckmässig durch Osmiumsäuredämpfe (cf. § 308). Die Präparate lässt man dann ohne Deckglas frei an der Luft stehen, event. durch eine grössere Glocke vor Staub geschützt. Die Glycerinlösung wird dann durch Verdunstung des Wassers derartig konzentriert, dass schliesslich eine Uebertragung in Alkohol möglich ist, ohne dass Kollaps einträte.

b) Die Verdrängung des Alkohols.

§ 18. Zur Verdrängung des Alkohols wurde früher fast ausschliesslich *Nelkenöl* verwandt, das auch in der That wegen seiner vollständigen Mischbarkeit mit Alkohol in vielen Fällen zu diesem Zwecke sehr geeignet ist. Bei auf dem Objektträger festgeklebten Mikrotomschnitten genügt es meist zur völligen Aufhellung, nach dem Abfliessenlassen des Alkohols einige Tropfen Nelkenöl auf das Präparat zu bringen. Dickere Schnitte, namentlich Freihandschnitte, bringt man am besten in ein kleines Gefäss mit Nelkenöl, in dem man sie so lange lässt, bis sie vollständig durchsichtig sind und auf dunklem Grunde nicht mehr weiss erscheinen.

Das Nelkenöl hat nun aber den Nachteil, manche Tinktionsmittel auszuwaschen und wird wegen seiner oxydierenden Eigenschaften von manchen Mikroskopikern zur Zeit ganz verworfen. In wieweit nun die zum Ersatz des Nelkenöls vorgeschlagenen anderen ätherischen Oele, wie *Origanumöl, Lavendelöl* und dergl. von diesen Nachteilen frei sind, bleibt noch zu untersuchen.

§ 19. Jedenfalls haben wir aber in dem *Xylol* ein Mittel, das sehr wohl das Nelkenöl zu ersetzen vermag. Bei Mikrotomschnitten wende ich dasselbe jetzt ganz ausschliesslich an, falls ich nicht gerade, wie z. B. bei der Gram'schen Methode (§ 321), die differenzierende Wirkung des Nelkenöls benutzen will.

Das Xylol hat nur den Nachteil, dass es sich mit Alkohol weniger leicht mischt und eine vollständigere Entwässerung der Objekte verlangt als Nelkenöl. Man beobachtet infolge dessen leicht milchige Trübungen und wird auch bei dickeren Schnitten

zweckmässig zwischen dem Alkohol und Xylol ein Gemisch von 3 Vol. Xylol und 1 Vol. Alkohol einschalten. Bei Mikrotomschnitten genügt es dagegen in den meisten Fällen, dieselben mit gewöhnlichem sogenanntem absolutem Alkohol (98%) zu übergiessen und dann Xylol zuzufügen. Der Anfänger wird jedoch gut thun, die Präparate vor dem definitiven Einschluss in Canadabalsam oder dergl. stets auf dunklem Grunde anzusehen; erscheinen dieselben dann weiss und undurchsichtig, so setzt man nochmals Alkohol zu und dann wieder Xylol, bis die Präparate vollständig durchsichtig geworden sind.

Erwähnen will ich an dieser Stelle noch, dass man in diesem Falle und überhaupt stets, wenn es sich darum handelt, etwas grössere Flüssigkeitsmengen auf den Objektträger zu bringen oder dergl., zweckmässig die Fig. 5 abgebildeten Glasflaschen benutzt, deren hohler Stopfen unten in eine Glasröhre endigt, während das obere Ende mit einer Kautschukkappe verschlossen wird. Hat man zunächst dadurch, dass man diese Kautschukkappe zusammendrückt und sich dann wieder ausdehnen lässt, Flüssigkeit in den Stöpsel eintreten lassen, so kann man offenbar durch abermaliges Drücken auf die Kautschukkappe beliebige Mengen von der in dem Stöpsel enthaltenen Flüssigkeit aus demselben austreten lassen. Bei Reagentien die man nur tropfenweise zufliessen lassen will, kann man auch zweckmässig, die in Figur 6 abgebildeten Flaschen benutzen, deren Stopfen unten einfach in einen Glasstab ausläuft.



Fig. 5. Glasflasche mit Pipette nach W. Behrens (I).

§ 20. Um nun bei zarteren Objekten den bei der Uebertragung in Nelkenöl oder Xylol eintretenden *Kollaps* zu verhindern, kann man sich zweckmässig der beiden von Overton (I, 12) vorgeschlagenen Methoden bedienen.

I. Handelt es sich zunächst darum die Objekte in *Nelkenöl* oder ein anderes ätherisches Oel zu übertragen, so bringt man die betreffenden Objekte aus dem Alkohol in eine kleine Schale oder dergl., die eine 10% Lösung des anzuwendenden Oeles in Alkohol enthält. Sodann stellt man dieses Gefäss



Fig. 6. Glasflasche mit Glasstab am Stopfen Nach W. Behrens (I).

in eine etwas grössere Schale oder einen beliebigen Exsiccator, dessen Boden mit festem Chlorcalcium bedeckt ist. Es wird dann der Alkohol allmählich von dem Chlorcalcium absorbiert und das Objekt schliesslich vollständig mit Oel durchtränkt. Um eine längere Einwirkung des Alkohols zu vermeiden, kann man auch die Objekte aus dem Alkohol in wasserfreies Chloroform und dann in eine 10% Lösung von Nelkenöl in Chloroform übertragen, aus der man dann das Chloroform, wie bei der soeben beschriebenen Methode den Alkohol, durch Chlorcalcium absorbieren lässt.

II. Zur Uebertragung in *Xylol* bringt man die Objekte in ein Schälchen mit 10% Lösung von Xylol in Alkohol und stellt dasselbe in einen Exsiccator, auf dessen Boden sich reines Xylol befindet. Es findet dann durch Diffusion ein derartiger Ausgleich zwischen den beiden Flüssigkeiten statt, dass die Präparate schliesslich in nahezu reinem Xylol liegen.

§ 21. Sodann lässt sich die Uebertragung aus *Alkohol in Xylol* bei sehr kleinen Objekten auch sehr gut mit Hilfe des von Fr. E. Schulze (I) empfohlenen *Senkcylinders* [1]) ausführen, der übrigens auch gleichzeitig die Uebertragung aus *Xylol in Canadabalsam* ermöglicht. In diesem Gefässe, dessen Konstruktion aus der nebenstehenden Figur 7 ohne weiteres verständlich sein dürfte, werden 3 verschiedene Flüssigkeiten übereinander geschichtet: zu unterst Xylol-Canadabalsam, dann Xylol und schliesslich Alkohol; in letzteren bringt man dann die zuvor entwässerten Objekte. Sind dieselben einigermassen klein, so sinken sie so allmählich zu Boden, dass sie ohne Kollaps in den Canadabalsam gelangen. Durch den seitlich am Senkcylinder angebrachten Hahn lässt man dann das Xylol und den Alkohol abfliessen und kann darauf die Präparate direkt auf dem Objektträger in Canadabalsam einschliessen.



Fig. 7. Senkcylinder nach E. Schulze.

c) Die Uebertragung in das Einschlussmittel.

§ 22. Zum Einschluss zoologischer oder botanischer Präparate in Canadabalsam bedient man sich jetzt wohl allgemein des

1) Derselbe ist von Warmbrunn, Quielitz u. Co., Berlin, C. Rosenthalerstrasse 40 zum Preise von 3,25 Mark zu beziehen.

flüssigen Canadabalsams, der durch Auflösung dieses Harzes in Chloroform, Xylol oder dergl. gewonnen wird. Namentlich die Auflösung im Xylol ist sehr empfehlenswert. Man füllt dieselbe zweckmässig in ein mit weiter Oeffnung gefülltes Glas (cf. Fig. 8), dessen Stopfen nach aussen über die Mündung desselben übergreift und derartig gewölbt ist, dass ein kleiner Glasstab auch in dem verschlossenen Glase Platz hat [1]).



Fig. 8. Canadabalsamglas, ca. 1/3 der natürlichen Grösse.

Ein *Kollaps* tritt bei der Uebertragung aus Nelkenöl oder Xylol in diesen flüssigen Canadabalsam im allgemeinen nicht ein; bei sehr zarten Objekten wird man zweckmässig den gewöhnlichen Xylol-Canadabalsam noch mit Xylol verdünnen und dieses dann allmählich aus dem Präparat verdunsten lassen.

Dass sich auch mit Hilfe des *Schulze*'schen Senkcylinders der Kollaps verhindern lässt, wurde bereits erwähnt (cf. § 21).

II. Die Uebertragung aus Wasser in Canadabalsam unter Vermeidung von Alkohol.

a) Durch Eintrocknenlassen.

§ 23. Eine Uebertragung aus Wasser in Canadabalsam ohne Anwendung von Alkohol kann in der Weise ausgeführt werden, dass man die Präparate einfach an der Luft austrocknen lässt und dann mit Xylol bedeckt, das die vollständig ausgetrockneten Schnitte meist schnell durchdringt, und schliesslich in Xylol-Canadabalsam einschliesst. Natürlich ist diese Methode nur bei solchen Präparaten anwendbar, bei denen durch das Austrocknen kein Kollaps hervorgerufen wird, also namentlich bei sehr dünnen Mikrotomschnitten.

b) Mit Anilin ($C_6H_5NH_2$).

§ 24. Da in Anilin 4 % Wasser löslich sind, kann dasselbe ebenfalls zur Entwässerung benutzt werden. Die Präparate werden direkt aus Wasser in Anilin gebracht und können dann in Canadabalsam eingeschlossen werden. Das Anilin kann durch festes

---

1) Derartige Gläser sind unter anderem zum Preise von 0,60 Mark von Dr. G. Grübler (Leipzig, Bayerische Strasse 12) zu beziehen.

Kaliumhydroxyd, das in demselben ganz unlöslich ist, entwässert werden (cf. Suchanek I).

c. Mit Phenol (C_6H_5OH).

§ 25. Bringt man Schnitte aus Wasser in Phenol, das man durch Erwärmen im Paraffinofen (cf. § 47) oder durch Zusatz von möglichst wenig Wasser zum Schmelzen gebracht hat, so werden die Schnitte in kurzer Zeit aufgehellt und genügend entwässert, um direkt in Nelkenöl oder Xylol übertragen werden zu können.

Um bei sehr empfindlichen Objekten den Kollaps zu verhindern, kann man auch nach der von Klebahn (I, 419) vorgeschlagenen Methode verfahren und die fixierten und gefärbten Objekte zunächst in verdünntes Glycerin übertragen, das man sich an der Luft konzentrieren lässt; dann setzt man Phenol zu, dem man allmählich Nelkenöl oder Kreosot zumischt, aus dem die Objekte dann in Canadabalsam übertragen werden können. Von Klebahn wurde diese Methode namentlich bei der Untersuchung der keimenden Desmidiaceen-Sporen angewandt, er führte in diesem Falle die verschiedenen Manipulationen auf Objektträgern mit hohlem Ausschliff aus.

III. Die Anwendung anderer stark lichtbrechender Einschlussmittel.

a) Dammarlack.

§ 26. Der Dammarlack wird zweckmässig in gleichen Teilen Benzol und Terpentinöl gelöst. Die Anwendung desselben ist dieselbe wie die des Canadabalsams, von dem er sich durch etwas geringeren Brechungsindex unterscheidet, so dass in demselben auf Brechungsdifferenzen beruhende Strukturverhältnisse häufig schärfer hervortreten. Man benutzt natürlich auch in diesem Falle zweckmässig die § 22 beschriebenen Gläser. In der botanischen Mikroskopie scheint derselbe übrigens bisher wenig angewandt zu sein.

b) Venetianischer Terpentin.

§ 27. Dies von Vosseler (II) vorgeschlagene Einschlussmittel wird bereitet, indem man das aus der Apotheke unter der obengenannten Bezeichnung bezogene Harz mit dem gleichen Volum Alkohol verdünnt, dann das Gemisch auf dem Wasserbade

erwärmt, energisch umschüttelt und filtriert. Das Filtrat wird dann auf dem Wasserbade noch etwas eingedickt.

Die so erhaltene Flüssigkeit hat den Vorteil, dass sie sich sogar mit 90 % Alkohol ohne Trübung mischt und somit auch bei nicht völliger Entwässerung eine vorherige Aufhellung mit Nelkenöl oder dergl. überflüssig macht. Ferner tritt selbst bei zarten Objekten, wie z. B. Spirogyren, bei der Uebertragung aus Alkohol in venetianischen Terpentin viel seltener ein Kollaps ein, als bei der Uebertragung in Nelkenöl, Canadabalsam oder dergl. Bei sehr empfindlichen Objekten kann man eine Schrumpfung auch dadurch vermeiden, dass man dieselben, nach der von Pfeiffer (I, 30) vorgeschlagenen Methode zunächst in ein Gemisch von 10 Teilen Terpentin und 100 Teilen Alkohol bringt und dann über wasserfreiem Chlorcalcium eine allmähliche Konzentrierung des Terpentins eintreten lässt. Benutzt man zu diesem Zwecke kleine Schalen, so kann man dieselben, um das Aufsteigen der verdünnten Terpentinlösung an den Wänden zu verhindern, zweckmässig mit einem Rande von Paraffin versehen, dadurch dass man dieselben einfach entsprechend tief in geschmolzenes Paraffin eintaucht.

Der Brechungsindex des venetianischen Terpentins liegt zwischen dem des Glycerins und dem des Dammarlacks, so dass also die Zellmembranen und Stärkekörner in demselben noch ziemlich scharf hervortreten.

Ein Nachteil des venetianischen Terpentins besteht darin, dass er sehr langsam fest wird. Um jedoch ein bei der Beobachtung mit Immersion in vielen Fällen wünschenswertes Festkleben der Deckgläschen auf dem Objektträger zu bewirken, kann man nach Vosseler (II, 297) in der Weise verfahren, dass man den Rändern des Deckglases einen erhitzten Metalldraht anlegt. Den gleichen Zweck kann man übrigens nach dem Vorschlage von Pfeiffer (I) auch durch Umranden mit Canadabalsam erreichen.

Verschiedene Tinktionen, wie namentlich Carmin-, Haematoxylin- und Safranin-Präparate, sollen sich nach Vosseler in dem venetianischen Terpentin ausgezeichnet konservieren lassen; nach meinen eigenen Erfahrungen scheint sich jedoch das Säurefuchsin in demselben weniger gut zu halten, wie in Canadabalsam.

6. Die Lebendfärbung.

§ 28. Wie namentlich durch die Untersuchungen von Pfeffer (II) gezeigt wurde, ist es in sehr vielen Fällen möglich, lebende Pflanzen und Pflanzenteile gewisse Farbstoffe aufnehmen zu lassen. Diese sogenannte *Lebendfärbung* ist nicht nur für die Erforschung der Stoffwanderungen innerhalb des pflanzlichen Organismus von grosser Wichtigkeit, sondern hat auch bereits hinsichtlich der Zellenmorphologie zu einigen interessanten Ergebnissen geführt und dürfte auch wohl sicher noch einer weiteren Anwendung fähig sein.

Zum Gelingen einer Lebendfärbung ist es nun vor Allem notwendig, dass die angewandten Farbstofflösungen auf die betreffenden Objekte keinen schädlichen Einfluss ausüben. Da nun aber die Anilinfarben auf die Pflanzenzellen im allgemeinen wie Gifte wirken, ist es nötig, dieselben in sehr verdünntem Zustande anzuwenden, in denen sie entweder nur wenig oder überhaupt nicht schädlich auf die Pflanzenzelle einwirken. Eine sichtbare Färbung kann dann aber offenbar nur dann eintreten, wenn der Farbstoff von gewissen Zellbestandteilen gespeichert wird, was im allgemeinen dann der Fall sein wird, wenn durch eine chemische Metamorphose des aufgenommenen Farbstoffes das osmotische Gleichgewicht zwischen der Zellflüssigkeit und der umgebenden Farbstofflösung fortwährend gestört wird. Um nun aber in dieser Weise eine Speicherung grösserer Farbstoffmengen zu ermöglichen, ist es ferner notwendig, den betreffenden Objekten auch eine grosse Menge von Farbstofflösung zur Verfügung zu stellen. Man nimmt deshalb auch die Lebendfärbung besser nicht auf dem Objektträger vor, sondern in Schalen oder Bechergläsern, die mindestens ½ Liter Flüssigkeit zu fassen vermögen, und bringt auch in diese keine allzu grossen Mengen der zu färbenden Objekte. Durch Bewegung der Flüssigkeit lässt sich schliesslich noch die Schnelligkeit der Färbung beschleunigen.

7. Die Fixierungs- und Tinktionsmethoden.

§ 29. Bei der Untersuchung der verschiedenen plasmatischen Bestandteile des Plasmakörpers, die zum grössten Teil farblos sind und sich häufig auch nur durch geringe Brechungsunterschiede von einander abheben, ist es in schwierigeren Fällen häufig nicht

möglich, am lebenden Material zu sicheren Resultaten zu gelangen. Dahingegen sind dann die in erster Linie von Anatomen und Zoologen ausgebildeten Fixierungs- und Tinktionsmethoden mit bestem Erfolg zu verwenden. Dieselben haben auch bereits bei der Untersuchuug des pflanzlichen Organismus zu so wichtigen Ergebnissen geführt, dass an ihrer Anwendbarkeit bei botanischen Untersuchungen nicht mehr der geringste Zweifel bestehen kann. Allerdings soll damit keineswegs behauptet werden, dass jetzt die Untersuchung des lebenden Materiales ganz aufgegeben werden sollte; im Gegenteil wird man dasselbe, soviel als irgend möglich, zur Kontrollierung und Deutung der an tingierten Präparaten gewonnenen Resultate zu Rate ziehen müssen.

§ 30. Zweck der *Fixierung* ist es nun, die betreffenden Organe in der Weise zu tödten, dass die Strukturverhältnisse derselben auch nach der Entfernung des Fixierungsmittels möglichst vollständig erhalten bleiben.

Zweck der *Tinktion* ist es, an den fixierten Präparaten ganz bestimmte Zellbestandteile, die man gerade untersuchen will, derartig zu färben, dass sie sich scharf von ihrer Umgebung abheben und eine Verwechslung derselben mit anderen Zellbestandteilen ausgeschlossen ist

Wir besitzen nun zur Zeit eine wahre Unzahl von Fixierungs- und Tinktionsmethoden und es werden auch jetzt noch die verschiedenartigsten neu entdeckten oder schon seit lange bekannten organischen und anorganischen Verbindungen auf ihre Brauchbarkeit zu Fixierungs- oder Tinktionszwecken geprüft. Wenn nun auch die meisten dieser Versuche zu irgend welchen neuen Aufschlüssen über die Morphologie der Zelle nicht geführt haben und Viele der von ihren Erfindern warm empfohlenen Methoden den längst bekannten bedeutend nachstehen, so ist doch ein derartiges Herumprobieren mit allen möglichen Salzen, Säuren und Farbstoffen keineswegs zu verwerfen. Bei der geringen Einsicht, die man bisher in die Mechanik der Färbung hat gewinnen können, ist es ja nur möglich, auf rein empirischem Wege zu brauchbaren Methoden zu gelangen, und es ist auch zur Zeit noch nicht abzusehen, in wie weit neu erfundene Farbstoffe oder neue Methoden zu weiteren Aufschlüssen über die Struktur der plasmatischen Bestandteile der Zelle führen werden.

§ 31. Der Ausfall einer Tinktion ist ja nicht nur von der Natur des angewandten Farbstoffes und dem Lösungsmittel des-

selben, sondern auch in hohem Grade von der Vorbehandlung des betreffenden Objektes, namentlich dem Fixierungsmittel, abhängig; ausserdem können noch nach der Tinktion durch Behandlung mit verschiedenen Salzlösungen, Säuren, Alkalien und dergl. oder durch Kombination verschiedener Farbstoffe brauchbare Resultate erlangt werden.

Wir werden nun namentlich in der dritten Abteilung dieses Buches eine grosse Anzahl von Fixierungs- und Tinktionsmethoden kennen lernen. An dieser Stelle soll dagegen nur die allgemeine Methodik der Fixierung und Tinktion besprochen werden.

A. Die Fixierung.

§ 32. Die Fixierung ist im allgemeinen um so vollkommener je schneller das Fixierungsmittel die zu fixierenden Zellen erreicht; deshalb wird man auch im allgemeinen mit möglichst *konzentrierten Lösungen*, soweit dieselben nicht Niederschläge hervorrufen oder irgendwie störend wirken, die besten Resultate erlangen. Ferner werden aber auch kleinere Objekte schneller von den Fixierungsflüssigkeiten durchdrungen als grössere, und man wird somit in schwierigen Fällen stets *möglichst kleine Stücke* von dem zu untersuchenden Objekte, event. nur wenige Zelllagen dicke Schnitte, in die Fixierungsflüssigkeiten bringen.

Namentlich ist aber zu beachten, dass die *Cuticula und der Kork* für die meisten Fixierungsflüssigkeiten sehr schwer permeabel, für manche sogar wohl ganz impermeabel sind. Man kann somit das Eindringen der Fixierungsflüssigkeiten in vielen Fällen dadurch bedeutend erleichtern, dass man die verkorkten Membranen möglichst entfernt oder wenigstens durch Einritzen derselben Durchgangsbahnen für die Fixierungsflüssigkeiten schafft.

Ferner folgt aus dem Obigen, dass bei Objekten, bei denen die Fixierungsflüssigkeiten nicht in allen Teilen die gleiche Wirkung ausgeübt haben, die in der Nähe der Schnittflächen gelegenen Partien im allgemeinen das grössere Vertrauen verdienen.

§ 33. Sind die zu fixierenden Objekte sehr leicht, so kann man sie durch Fliesspapierstreifen leicht am Boden des die Fixierungsflüssigkeit enthaltenden Gefässes festklemmen. Namentlich bei schwer benetzbaren Objekten, ist es jedoch vielfach vorteilhaft, dieselben ganz mit der Fixierungsflüssigkeit zu *injicieren,* was man mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe leicht ausführen kann.

Ueber die zur vollständigen Fixierung notwendige *Zeitdauer*

lassen sich keine allgemeinen Angaben machen; dieselbe ist ausser von der Grösse der Objekte in erster Linie von der Beschaffenheit der angewandten Fixierungsflüssigkeit abhängig und es sollen denn auch bei der Besprechung der einzelnen Methoden hierüber möglichst genaue Angaben gemacht werden.

Ebenso ist ferner auch die *Menge der anzuwendenden Fixierungsflüssigkeiten* eine sehr verschiedene; im allgemeinen wird man jedoch von den energisch wirkenden Fixierungsflüssigkeiten, wie z. B. den sublimathaltigen, nur relativ wenig Flüssigkeit bedürfen, während namentlich bei dem Kaliumbichromat die Anwendung grosser Flüssigkeitsmengen empfohlen wird.

§ 34. Zur *Fixierung von Objekten, die sich leicht schwärzen,* empfiehlt Overton (I, 9) Alkohol, der schweflige Säure enthält. Er bereitet denselben in der Weise, dass er ½ gr schwefligsaures Natron ($SO_3 Na_2$) mit einigen ccm 80% Schwefelsäure zusammenbringt und die entstehenden Dämpfe von schwefliger Säure direkt in 100 gr Alkohol leitet. Auch Pikrinsäure, in Wasser oder 30—50% Alkohol gelöst, kann in derselben Weise mit schwefliger Säure kombiniert werden. An den mit den genannten Flüssigkeiten behandelten Präparaten sollen die feinsten plasmatischen Differenzierungen erhalten bleiben und auch Färbungen mit Haematoxylin oder Carmin ausgezeichnet gelingen.

B. Das Auswaschen der Fixierungsflüssigkeiten.

§ 35. Im allgemeinen ist es notwendig vor der Tinktion die angewandten Fixierungsflüssigkeiten wieder vollständig zu entfernen. Welche Flüssigkeit man nun zu diesem *Auswaschen* der Präparate am zweckmässigsten verwendet, hängt natürlich von der Beschaffenheit des angewandten Fixierungsmittels ab. Ist dasselbe in Wasser leicht löslich, so benutzt man wohl stets am besten *fliessendes Wasser* und zwar verwendet man hierbei zweckmässig die von Steinach (I) empfohlenen *Siebdosen*, die auch zu anderen Zwecken mit grossem Vorteil angewandt werden können. Dieselben enthalten, wie Fig. 9 im Durchschnitt zeigt, ein *Glassieb*, das auf drei kleinen Glasfüssen ruht und in der unteren Fläche zahlreiche nach unten weiter werdende Oeffnungen besitzt. Die äussere Dose dient dazu die betreffenden Objekte bei an-

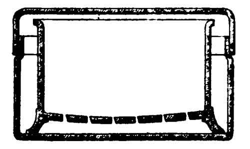


Fig. 9. Steinach'sche Siebdose im Längsschnitt, nach Steinach (I).

derweitiger Anwendung luftdicht nach aussen abzuschliessen [1]).

Hat man zahlreiche Objekte gleichzeitig in fliessendem Wasser auszuwaschen, so kann man auch eine Auswaschvorrichtung, die vor zwei Jahren im hiesigen botanischen Institut angebracht wurde und sich ausgezeichnet bewährt hat, mit Vorteil benutzen.

Dieser Apparat, dessen Konstrukton aus der nebenstehenden Figur 10 leicht verständlich ist, besteht im wesentlichen aus dem mit 9 kleinen Hähnen versehenen Messingrohr a und dem zur Aufnahme der auszuwaschenden Objekte dienenden Zinkgefässe d. Da jedoch die kleinen Hähne den vollen Druck der Wasserlei-

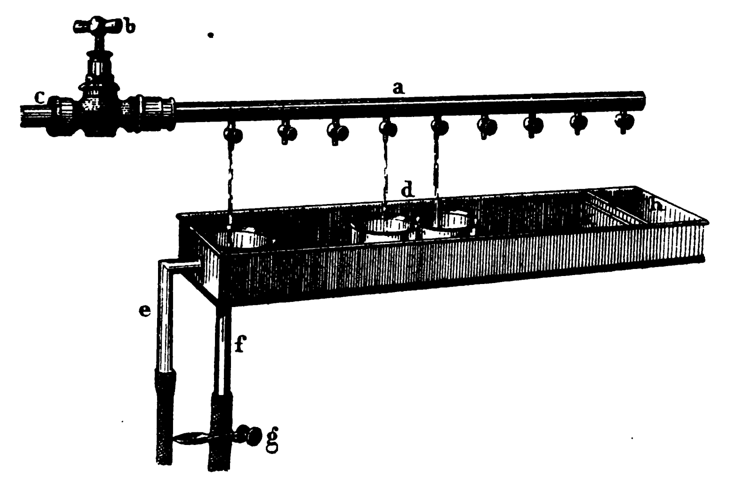


Fig. 10. Auswaschapparat.

tung nicht auszuhalten vermögen, geschieht der volle Abschluss und die gröbere Regulierung des Wasserstromes durch den grossen Hahn b, der mit Hilfe eines T-Rohres bei c leicht an jedem Wasserleitungshahne seitlich eingeschaltet werden kann. Bei dem Zinkgefässe dient der grössere Raum d zur Aufnahme der Glassiebe; soll das Wasser aus demselben schnell ablaufen, so wird der Quetschhahn g geöffnet, so dass das Wasser durch das mit dem Boden des Zinkgefässes kommunizierende Rohr f abfliesst; soll das Wasser dagegen langsamer abfliessen, so wird der Quetschhahn g geschlossen und das Wasser kann dann nur durch das Rohr e

1) Diese Siebdosen sind zu beziehen von R. Siebert, Wien VIII. Alserstrasse Nr. 19, neuerdings auch von Dr. Grübler. Letzterer liefert die Glassiebe allein zum Preise von M. 1,25 pro Stück.

ablaufen, dessen Mündung von dem Boden des Gefässes 15 mm entfernt ist, so dass also das Wasser dann in dem Zinkgefässe 15 mm hoch steht. Ueber die Bestimmung des Raumes h, vergl. § 39.

C. Die Tinktion.

§ 36. Hat man grössere Objekte in die Fixierungsflüssigkeit gebracht, so pflegt man dieselben gewöhnlich nach dem Auswaschen in Schnitte zu zerlegen und an diesen die Tinktion auszuführen. In manchen Fällen erhält man aber auch sehr gute Bilder, wenn man die betreffenden Objekte direkt nach dem Auswaschen in die Tinktionsflüssigkeit bringt und erst nachher Schnitte aus ihnen anfertigt. Bei dieser sogenannten »*Durchfärbung*« oder »*Stückfärbung*« ist wieder die schwere Permeabilität der *Cuticula* zu beachten und event. durch gänzliche Entfernung oder Einritzen derselben das Eindringen des Farbstoffes zu erleichtern.

In manchen Fällen kann es von Nutzen sein, dass man bei der Durchfärbung auf ein und demselben Schnitte alle verschiedenen Grade der Tinktion nebeneinander erhält, indem die unmittelbar an der Schnittfläche gelegenen Partien am intensivsten gefärbt sind, während die Färbungsintensität mit der Entfernung von der Schnittfläche ganz allmählich abnimmt.

Hat man gleichzeitig eine grössere Anzahl von Objekten zu färben, so kann man zweckmässig die § 35 erwähnten Glassiebe benutzen. Namentlich bei kleineren Pflanzenteilen oder Schnitten verwendet man vielfach auch zweckmässig die in Figur 11 abgebildeten Glasschalen, deren Deckel eine dem oberen Rande der Schale entsprechende Vertiefung besitzen.

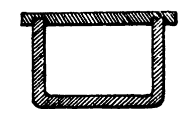


Fig. 11. Glasschale mit Deckel im Medianschnitt.

Hat man in diesem Falle konzentrierte Farblösungen verwandt, so ist es häufig schwer, die einzelnen Objekte deutlich zu erkennen; man benutzt dann zweckmässig einen kleinen Apparat, dem Ranvier (I, 66) den Namen *Lichtträger* (»photophore«) gegeben hat, den man aber wohl zweckmässiger mit Obersteiner (I, 55) als *Schnittsucher* bezeichnet. Derselbe besteht etwa aus einem ca. 5 cm hohen und 10—12 cm langen und breiten Holzkästchen, dessen vordere Wand fehlt, während die obere durch eine Platte von Spiegelglas ersetzt ist. In diesem Kasten bringt man dann einen kleinen Glasspiegel an, der derartig nach vorne zu geneigt ist, dass er mit dem Boden

einen Winkel von 25—30° bildet. Wird dann dieser Spiegel einem hell beleuchteten Fenster zugekehrt, so reflektiert derselbe das Licht offenbar gegen die den Kasten nach oben abschliessende Glasplatte, resp. gegen die auf dieselbe gestellte Schale mit der Farbstofflösung.

Man kann sich einen solchen Apparat natürlich sehr leicht selbst zusammensetzen. Sehr zweckmässig ist übrigens auch wohl der von Eternod (I, 41) beschriebene Apparat, der in Fig. 12 abgebildet ist. Bei demselben funktioniert der vordere Teil der Glasplatte c, die durch den Spiegel b beleuchtet wird, als Schnitt-

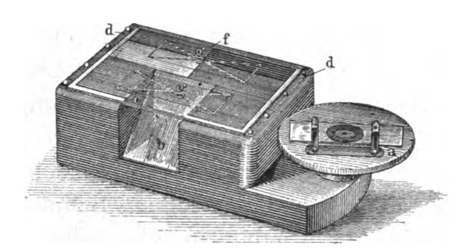


Fig. 12. Apparat nach Eternod.

sucher, während sich unterhalb des hinteren Teiles der Glasplatte (d — d) ein in verschiedenfarbige Abteilungen geteilter Kartonstreifen befindet. Ausserdem dienen die mit dem Diamant angefertigten Zeichnungen bei g, wie leicht ohne weiteres verständlich sein dürfte, zum Zentrieren von Präparaten auf dem Objektträger und die kleine Drehscheibe a zum Anfertigen von kreisförmigen Lackringen etc.

§ 37. *Mikrotomschnitte,* die nachträglich gefärbt werden sollen, werden im allgemeinen auf dem Objektträger festgeklebt (vergl. § 50—52). Will man nun gleichzeitig eine grössere Menge von Schnitten in ein und dieselbe Farbstofflösung bringen, so kann dies sehr zweckmässig mit Hilfe einer Anzahl von Krystallisierschalen geschehen, die in der aus der nebenstehenden Figur 13 ersichtlichen Weise ineinandergestellt sind. Der zwischen zwei Krystallisierschalen befindliche Raum wird dann mit der betreffenden Farbstofflösung angefüllt und die Objektträger so in demselben aufgestellt, dass die mit den Schnitten versehene Seite nach Aussen gekehrt ist. Es ist dann ein Verletzen oder Abstreifen der Schnitte natürlich ausgeschlossen. Die Krystallisierschalen werden übrigens am besten nicht aufeinander festgeklebt, sondern einfach ineinan-

der gestellt und die innerste, um ein Auftreiben durch die Flüssigkeit in den äusseren Schalen zu verhindern, durch Schrotkörner oder dergl. belastet. Um endlich die verschiedenen Objekte inner-

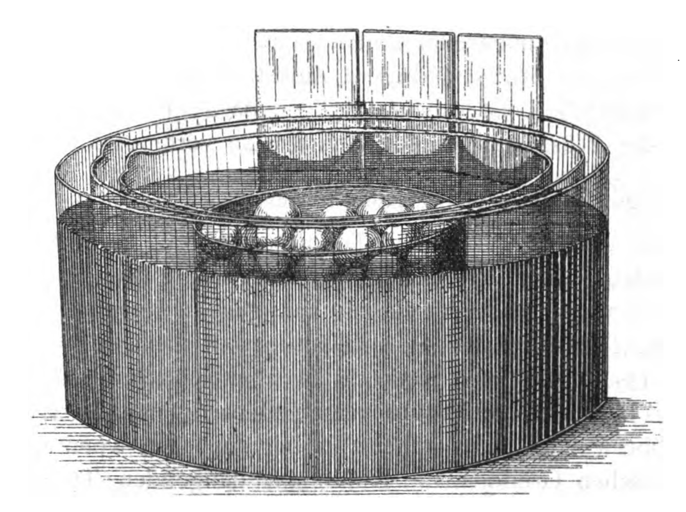


Fig. 13. Apparat zum Färben von Mikrotomschnitten.

halb des Apparates von einander unterscheiden zu können, benutzt man zweckmässig mit einem Ausguss versehene Krystallisierschalen; wenn man dann von dem Ausguss aus immer nach derselben Seite hin fortschreitend die Füllung des Apparates mit Objektträgern ausführt, so hat man nur nötig, sich die Reihenfolge, in der die einzelnen Präparate aufgestellt wurden, zu merken.

§ 38. Bezüglich weiterer Einzelheiten muss auf die Besprechung der einzelnen Methoden verwiesen werden. An dieser Stelle sei nur noch erwähnt, dass man in relativ seltenen Fällen die Präparate direkt in dem Zustande, in dem man sie aus der Färbeflüssigkeit herausnimmt, untersucht. Sehr häufig erhält man sehr brauchbare Tinktionen dadurch, dass man die Präparate zunächst stark »*überfärbt*« und dieselben dann mit Wasser, Alkohol, verdünnten Säuren oder dergl. auswäscht, bis nur noch bestimmte Inhaltskörper der Zellen gefärbt erscheinen. In manchen Fällen ist sogar eine Nachbehandlung der tingierten Präparate mit mehreren verschiedenen Flüssigkeiten zur Erlangung wohl »*differenzierter*« Bilder notwendig.

§ 39. Um *Mikrotomschnitte in laufendem Wasser auszuwaschen,* kann man sich zweckmässig des § 35 besprochenen und abgebil-

deten Apparates bedienen und zwar werden die betreffenden Objektträger in dem Raume h des Zinkgefässes derartig schief aufgestellt, dass die die Schnitte tragende Seite nach unten gerichtet ist. Damit übrigens das Wasser aus diesem Raume stets von unten abfliesst ist der Zinkstreifen i nahe seiner unteren Kante siebartig durchbohrt, der etwas niedrigere Zinkstreifen k, der am Grunde nicht durchlöchert ist, dient dagegen dazu, ein allzu schnelles Sinken der Flüssigkeit in den Raum h zu verhindern.

D. Die Fixierung und Tinktion mikroskopisch kleiner Objekte.

§ 40. Die Fixierung und Tinktion mikroskopisch kleiner Objekte bietet, namentlich wenn man nur geringe Mengen von Untersuchungsmaterial zur Verfügung hat, gewisse technische Schwierigkeiten. Dieselben werden wohl am besten nach der von Overton (I, 13) angegebenen Methode, die aber je nach der Beschaffenheit der betreffenden Objekte verschiedenartig modifiziert werden kann, überwunden. So scheint es mir zunächst, wenn nicht aus irgendwelchen Gründen die Kultur im hängenden Tropfen notwendig war, zweckmässiger, die sogleich zu beschreibenden Manipulationen, nicht auf dem Deckgläschen, wie dies von Overton empfohlen wird, sondern auf dem Objektträger auszuführen.

Um nun zunächst die in einem Tropfen der Kulturflüssigkeit befindlichen Objekte zu *fixieren*, verwendet man ein leicht wieder zu entfernendes Fixierungsmittel. Sehr geeignet sind zu diesem Zwecke z. B. *Joddämpfe*, die man aus einem erhitzten Reagenzglase auf das Präparat herabströmen lässt und die sich durch nachheriges Erwärmen (etwa 2—5 Minuten auf dem Paraffinofen) leicht wieder vollständig entfernen lassen. Zu dem gleichen Zwecke können aber auch *Osmiumsäuredämpfe* dienen, die man in der Weise auf das Präparat wirken lässt, dass man dasselbe mit den Objekten nach unten auf den Hals einer Osmiumsäure enthaltenden Flasche bringt.

Nach der Fixierung werden dann die Objekte in *Alkohol* übertragen. Dies geschieht in der Weise, dass man zunächst einen Tropfen 10 oder 20% Alkohols zusetzt, der keinen Kollaps bewirkt, und dann dadurch, dass man das Präparat in einen mit Alkoholdämpfen gesättigten abgeschlossenen Raum bringt, eine allmähliche Konzentration des Alkohols bewirkt. Zu diesem Zwecke kann man z. B. eine flache Krystallisierschale benutzen, deren oberer Rand abgeschliffen ist, so dass durch eine eingefettete

Glasscheibe ein hermetischer Verschluss der Schale bewirkt werden kann. Der Boden derselben wird mit absolutem Alkohol bedeckt und ausserdem in derselben ein zur Aufnahme der Präparate dienendes Gestell angebracht, das man sich am einfachsten aus einem an den Enden umgebogenen Streifen von Zinkblech herstellen kann. Auf diesen setzt man nun nach Overton die auf dem Deckgläschen befindlichen Objekte zweckmässig in der Weise, dass man das Deckgläschen mit der feuchten Seite nach oben auf ein etwa 3 mm hohes Hollundermarkplättchen bringt, dessen Durchmesser kleiner ist als der des Deckgläschens und das selbst auf einem gewöhnlichen Objektträger ruht. In diesem Apparate, der vor plötzlichen Temperaturschwankungen, namentlich direkter Besonnung, zu schützen ist, wird nun im Verlauf weniger Stunden der auf dem Deckgläschen befindliche 20% Alkohol durch Diffussion durch die Luft in nahezu absoluten Alkohol verwandelt. Ist dies geschehen, so wird auf das Deckgläschen ein Tropfen verdünnter Celloidinlösung gebracht und durch Hin- und Herneigen desselben gleichmässig auf dessen oberer Fläche verteilt. Es ist hierbei vorteilhaft, die Celloidinschicht möglichst dünn zu machen, da sich dickere Schichten einerseits leichter ablösen und andererseits auch die nachfolgenden Manipulationen sehr erschweren. Man muss deshalb ziemlich verdünnte Celloidinlösungen anwenden; eine geeignete Lösung erhält man z. B., wenn man eine gewöhnliche officinelle Celloidinlösung mit dem 10fachen Quantum eines Gemisches von gleichen Volumen Alkohol und Aether vermischt.

Sobald nun das Celloidin nicht mehr merklich fliesst, wird sodann das ganze Deckgläschen (resp. der Objektträger), mit der feuchten Seite nach oben unter 80% Alkohol getaucht, in dem die Celloidinschicht in wenigen Minuten derartig erstarrt, dass die Objekte, ohne dass eine Loslösung stattfände, in beliebige Farblösungen etc. getaucht werden können. Nur eine länger dauernde Einwirkung von mehr als 90% Alkohol ist zu vermeiden, da dieser die Celloidinschicht auflöst. Overton entwässert deshalb mit 80—85% Alkohol und benutzt bei der Uebertragung in Canadabalsam *Kreosot*, das sich schon mit 70% Alkohol mischt. Aus dem Kreosot bringt er die Präparate dann entweder direkt in Canadabalsam oder lässt sie erst Xylol passieren. Uebrigens kann man zu dem gleichen Zwecke auch *Anilin* anwenden, indem man die betreffenden Objekte aus 90% Alkohol in Anilin, aus diesem

in ein Gemisch von gleichen Volumen Anilin und Xylol und dann in Xylol überträgt (vergl. § 24).

Zu bemerken ist ferner noch, dass manche Farbstoffe, wie z. B. Gentianaviolett, eine starke *Mitfärbung der Celloidinhaut* bewirken und somit bei dieser Methode nicht zu verwenden sind.

8. Die Mikrotomtechnik.

§ 41. Während das Mikrotom von Anatomen und Zoologen schon seit Jahren allgemein benutzt wird, ist dasselbe von den Botanikern erst in den letzten Jahren in umfassenderer Weise angewandt worden. Da jedoch, soviel mir bekannt, niemand, der sich in neuerer Zeit die Mühe gegeben hat, sich mit der Mikrotomtechnik vertraut zu machen, die grossen Vorteile der Mikrotommethoden bestritten hat, scheint es mir überflüssig, an dieser Stelle auf die Vor- und Nachteile derselben näher einzugehen.

Bemerken will ich in dieser Hinsicht nur, dass die im folgenden beschriebenen Methoden für sehr harte Objekte, speziell für Hölzer, nicht anwendbar sind, während sie mir bei allen weichen Gebilden, aber auch bei den meisten Blättern und krautigen Stengeln oder Wurzeln sehr gute Resultate geliefert haben.

Inwieweit die von Vinassa (I und II) zum Schneiden sehr harter Objekte vorgeschlagenen Methoden, die ein eigens zu diesem Zwecke konstruiertes festeres Mikrotom erfordern, einer allgemeinen Anwendung fähig sind, vermag ich aus Mangel an eigener Erfahrung nicht zu beurteilen. Erwünscht wäre es aber jedenfalls, die Vinassa'schen Methoden womöglich derartig zu modifizieren, dass auch die plasmatischen Elemente bei der Vorbehandlung der Objekte erhalten bleiben.

§ 42. Ich verzichte darauf, die verschiedenen Mikrotome und ihre Handhabung an dieser Stelle ausführlich zu beschreiben; ich bemerke in dieser Hinsicht nur, dass ich mit einem relativ kleinen Mikrotome von Schanze die besten Resultate erhalten habe, nämlich Schnitte von 1 Mikron und sogar von Bruchteilen desselben.

Bei demselben geschieht wie aus Figur 14 ersichtlich ist, sowohl die Bewegung des Messers als auch die Hebung des Objektes mit Hilfe von Schrauben. Um sehr feine Schnitte zu erhalten, bewegt man ferner die Scheibe, welche mit der objekthebenden Schraube in Verbindung steht durch ein in dieselbe

eingreifendes Zahnrad, das direkt 1 μ anzeigt und eine Schätzung von Bruchteilen desselben gestattet [1]).

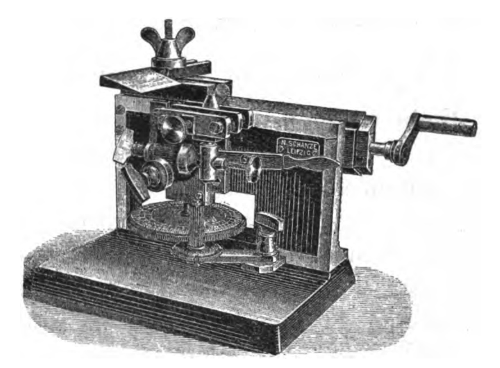


Fig. 14. Mikrotom von Schanze.

Ausserdem habe ich übrigens auch längere Zeit mit einem kompendiöseren Mikrotom von Aug. Becker (Göttingen) gearbeitet, das ebenfalls sehr exakt gearbeitet war.

Von den verschiedenen benutzten *Mikrotommessern* fand ich am geeignetsten, die von Henking (I) empfohlenen Messer mit ganz kurzer Schneide [2]) (cf. Fig. 15).

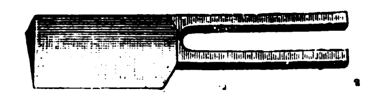


Fig. 15. Mikrotommesser nach Henking.

Spezieller eingehen möchte ich auf die *Einbettung der zu schneidenden Objekte* und die mit den Mikrotomschnitten auszuführenden Manipulationen, namentllich das *Festkleben derselben auf dem Objektträger*. Allerdings kann es auch hier nicht meine Aufgabe sein, die sehr zahlreichen bisher von den verschiedenen Autoren empohlenen Methoden sämtlich zusammenzustellen, vielmehr glaube ich mich auf die genaue Beschreibung einiger weniger Methoden, deren Zuverlässigkeit ich zu erproben Gelegenheit hatte,

1) Dieses Mikrotom wurde nach Angaben von Prof. Altmann konstruiert und ist vom Mechaniker M. Schanze (Leipzig, Brüderstr. 63) zu beziehen.

2) Dieselben sind z. B. von W. Walb (Heidelberg, Hauptstr. 5) unter der Bezeichnung »Mikrotommesser nach Henking« zum Preise von 4,50 Mark zu beziehen.

beschränken zu sollen. So will ich denn auch namentlich, was die verschiedenen Einbettungsarten anlangt, nur die Paraffinmethode, die wohl für pflanzliche Objekte bei weitem die geeignetste sein dürfte, an dieser Stelle ausführlich besprechen [1]).

I. Die Einbettung in Paraffin.

§ 43. Zur Einbettung in Paraffin können sowohl *durchgefärbte*, als *ungefärbte* Objekte verwandt werden. Handelt es sich um irgendwelche Plasmastrukturen, so müssen dieselben aber natürlich vorher sorgfältig *fixiert* und es muss event. auch das Fixierungsmittel vor dem Einbetten wieder ausgewaschen sein.

Die *Grösse der einzubettenden Stücke* richtet sich natürlich nach der Natur der Objekte. Im allgemeinen ist es jedoch vorteilhaft *möglichst kleine* Stücke zu verwenden, denn einerseits werden kleinere Stücke schneller von den verschiedenen Flüssigkeiten durchdrungen, und andererseits ist es um so leichter sehr feine Schnitte zu erhalten, je kleiner die zu schneidende Fläche ist.

§ 44. Natürlich ist es ferner keineswegs gleichgiltig, welche *Paraffinsorte* man zum Einbetten anwendet. Ich benutzte bisher in den meisten Fällen ein von Altmann empfohlenes Paraffin, das bei 58—60° C. schmilzt und aus der Droguenhandlung von Franz Wittig (Leipzig) bezogen wurde. Wenn es dagegen mehr auf Grösse als auf geringe Dicke der Schnitte ankommt, was z. B. bei Uebersichtsbildern und dergl. der Fall sein kann, so verwendet man zweckmässiger Paraffin, dem eine mehr oder weniger grosse Menge von dem vom Grafen Spee empfohlenen überhitzten Paraffin zugesetzt ist; die hierin eingebetteten Objekte haben auch den Vorteil, dass sie sich beim Schneiden viel weniger leicht aufrollen.

Man kann dies überhitzte Paraffin in der Weise bereiten, dass man gewöhnliches Paraffin in offener Schale 1—6 Stunden erhitzt, bis es unter Entwicklung unangenehmer weisser Dämpfe, geringer Reduktion seines Volumens und Erhöhung seines Schmelzpunktes eine braungelbe, dem gelben Wachs ähnliche Farbe angenommen hat. Uebrigens kann man neuerdings derartiges überhitztes Paraffin auch direkt von Dr. G. Grübler u. a. beziehen.

§ 45. In allen Fällen muss der Uebertragung in Paraffin eine

1) Für Einführung in die Mikrotomtechnik bin ich Herrn Professor Dr. R. Altmann, Prosektor an der Anatomie zu Leipzig, zu grossem Danke verpflichtet. Von demselben stammen auch im wesentlichen die im folgenden mitgeteilten Methoden.

vollständige *Entwässerung* der betreffenden Objekte vorausgehen; diese wird gewöhnlich durch *Alkohol* geschehen können. Zartere Objekte wird man übrigens, um Kollaps zu vermeiden, besser nicht direkt aus Wasser in Alkohol übertragen, vielmehr wird man bei diesen zweckmässig eine der § 14—17 aufgezählten Entwässerungsmethoden anwenden. Im allgemeinen genügt es jedoch, zwischen Wasser und Alkohol ein Gemisch von gleichen Volumen dieser Flüssigkeiten einzuschalten, in dem man die betreffenden Objekte etwa eine Stunde oder auch beliebig länger belässt, während man dieselben in dem absoluten Alkohol je nach der Grösse 6—24 Stunden, in manchen Fällen auch mehrere Tage verweilen lassen muss.

§ 46. Aus dem Alkohol kommen dann die Objekte in ein Gemisch von *3 Volumteilen Xylol und 1 Volumteil Alkohol*, in dem sie ebenfalls 12—24 Stunden verbleiben [1]). Daraus werden sie dann in reines *Xylol* übertragen, in dem man sie im allgemeinen wieder 12—24 Stunden belässt. Die völlige Durchtränkung mit Xylol kann man daran erkennen, dass dann die Präparate durchsichtig erscheinen.

Erwähnen will ich hier noch, dass man zu dieser Uebertragung aus Alkohol in Paraffin vielfach an Stelle von Xylol auch *Chloroform*, *Terpentinöl* oder *Toluol* verwandt hat; es ist mir jedoch zweifelhaft, ob diese Stoffe in der That dem Xylol gegenüber erhebliche Vorteile bieten. Jedenfalls ist aber dem zwischen Alkohol und Xylol früher wohl allgemein eingeschalteten Nelkenöl das oben erwähnte Alkohol - Xylol - Gemisch entschieden vorzuziehen.

§ 47. Aus dem Xylol werden dann die Objekte in geschmolzenes *Paraffin* übertragen; um jedoch den bei der direkten Uebertragung aus Xylol in Paraffin fast stets eintretenden Kollaps zu verhindern, ist es erforderlich, eine *Lösung von Paraffin in Xylol* einzuschalten. Ich verfahre nun zur Zeit mit bestem Erfolg gewöhnlich in der Weise, dass ich in ein sogenanntes Vogelnäpfchen ein Gemisch von Xylol und Paraffin bringe, das bei gewöhnlicher Temperatur ganz fest ist oder wenigstens breiartige Konsistenz besitzt; auf genaue Einhaltung eines bestimmten Mischungsverhältnisses kommt es hier übrigens nicht an. Auf

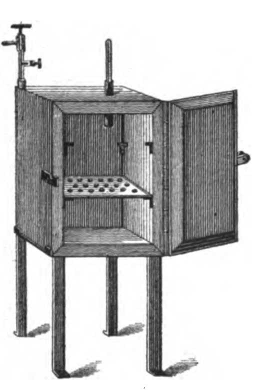
1) Zu allen diesen Uebertragungen sind die Steinach'schen Glassiebe (cf. § 35) sehr gut zu verwenden.

dies erkaltete und also feste Paraffin - Xylol - Gemisch bringe ich dann die zu schneidenden Objekte und giesse soviel reines Xylol darauf, dass dieselben sämtlich von der Flüssigkeit bedeckt werden. Sodann stelle ich die Näpfchen unbedeckt auf die obere Fläche des sogleich noch näher zu beschreibenden Paraffinofens, auf dem dann das Paraffin-Xylol-Gemisch allmählich schmilzt, so dass die mit Xylol durchtränkten Objekte in dasselbe heruntersinken können. Durch die allmähliche Verdunstung des Xylols wird dann noch eine weitere Konzentration des Xylol-Paraffins herbeigeführt.

Nach 6—24 Stunden bringe ich dann die Objekte in ein mit geschmolzenem Paraffin gefülltes Vogelnäpfchen, das ich in den Paraffinofen hineinstelle, während ich das Vogelnäpfchen mit dem Xylol-Paraffingemisch erkalten lasse, um es wieder von Neuem in der oben beschriebenen Weise zu benutzen.

In dem geschmolzenen Paraffin verbleiben die Objekte je nach ihrer Grösse 12—24 Stunden, selten ist eine längere Zeit erforderlich.

Als *Paraffinofen* benutze ich in Tübingen mit bestem Erfolg einen gewöhnlichen doppelwandigen Trockenschrank (cf. Fig. 16), dessen Mantel mit Paraffinum liquidum gefüllt ist, in welches ein Desaga'scher Termostat hineinragt. Derselbe wird so eingestellt, dass die Temperatur des flüssigen Paraffins ca. 63° C. beträgt [1]).



§ 16. Paraffinofen.

§ 48. Um nun schliesslich die mit Paraffin völlig durchtränkten Objekte in einen zum Schneiden geeigneten *Paraffinklotz* zu bringen, verfährt man zweckmässig in der Weise, dass man zunächst in ein Uhrglas von ca. 60 cm Durchmesser einen Tropfen Glycerin bringt und denselben dann mit einem Tuche auf der inneren Fläche des Uhrgläschens derartig verreibt, dass nichts mehr von dem Glycerin zu sehen ist [2]).

1) Sehr zweckmässig ist auch wohl das von P. Mayer (I) empfohlene sogenannte »*Neapler Wasserbad*«.

2) Es hat dies den Zweck, die nachherige Loslösung des Paraffins vom Uhrgläschen zu erleichtern.

Sodann wird das Uhrgläschen etwas erwärmt und mit geschmolzenem Paraffin gefüllt. Ist dieses bis nahe an den Schmelzpunkt erkaltet, was man daran erkennt, dass das Paraffin bei leichtem Anblasen am Rande erstarrt, so bringt man die einzuschmelzenden Objekte in dasselbe hinein und orientiert sie mit erhitzten Nadeln derartig, dass man nachher aus der erstarrten Masse geeignete Paraffinklötze schneiden kann.

Um nun aber die Krystallbildung innerhalb des erkaltenden Paraffins möglichst zu verhindern, ist es zweckmässig, dasselbe so *schnell als möglich abzukühlen;* dies wird am besten dadurch erreicht, dass man die Uhrgläschen, sobald man die Objekte orientiert hat, auf ein grosses Gefäss mit kaltem Wasser bringt, auf dem sie bei vorsichtigem Aufsetzen leicht zum Schwimmen zu bringen sind. Aus demselben Grunde ist es auch angezeigt, die Objekte in die Nähe des Randes des Uhrgläschens zu bringen, wo das Paraffin am dünnsten ist.

Ist nun das Paraffin völlig erkaltet, so lässt es sich leicht von dem Uhrgläschen loslösen und wird dann in ca. 2—3 cm lange rechteckige Klötze zerlegt, an deren einem Ende sich das zu schneidende Objekt befindet, während das andere direkt in den Objekthalter des Mikrotoms eingespannt wird. Zuvor wird aber der Paraffinklotz an dem Objektende noch derartig zugespitzt, dass das Objekt zwar ganz in Paraffin eingehüllt bleibt, dass die Schnittfläche aber möglichst klein und rechteckig wird. Beim Schneiden ist dieses Rechteck dann so zu orientieren, dass zwei Seiten desselben der Schneide des senkrecht zur Bewegungsrichtung gestellten Mikrotommessers parallel laufen.

§ 49. Es mag an dieser Stelle noch hervorgehoben werden, dass man kleine Paraffinklötze auch sehr leicht auf parallelepipedische Korkstücken festschmelzen kann, die dann in den Objekthalter des Mikrotoms eingeklemmt werden können. Man hat zu diesem Zwecke nur nötig, auf die eine Fläche des betreffenden Korkstückes einige Tropfen geschmolzenen Paraffins zu bringen, den Paraffinklotz schnell darauf zu legen und dann mit einer erhitzten Metallschaufel oder dergl. die Ränder desselben zu umfahren, so dass sie völlig anschmelzen. Es ist dies Verfahren namentlich dann zweckmässig anzuwenden, wenn man plötzlich zu einer anderen Schnittrichtung, etwa vom Quer- zum Längsschnitt, übergehen will. Ist es zu diesem Zwecke erforderlich, den Paraffinklotz zu zerschneiden,

so verwendet man hierzu zweckmässig über der Flamme erhitzte Messer, da dadurch ein Zerbröckeln des Präparates verhindert wird.

Zur Aufbewahrung der Paraffinklötze benutzt man zweckmässig Schachteln von sogenannten schwedischen Streichhölzern.

II. Das Aufkleben der Schnitte.

§ 50. Um aus den mit Paraffin erfüllten Mikrotomschnitten das Paraffin herauslösen zu können, klebt man dieselben gewöhnlich auf einem Objektträger fest. Obwohl nun in neuerer Zeit eine grosse Anzahl zu diesem Zwecke dienender Aufklebemethoden vorgeschlagen wurde, will ich mich doch darauf beschränken, vier derselben, von denen mir jede für bestimmte Fälle gewisse Vorteile zu besitzen scheint, etwas ausführlicher zu beschreiben.

A. Aufkleben mit Collodium.

Bei der ersteren derselben wird zum Aufkleben eine ca. 5 % Lösung von dem offizinellen Collodium in Alkohol benutzt, die man zweckmässig in einer Flasche aufbewahrt, durch deren durchbohrten Kork ein weicher Pinsel hindurchgeführt ist. Von dieser Lösung lässt man nun zunächst einen Tropfen unter die auf dem Objektträger in der gewünschten Weise angeordneten Schnitte fliessen, legt ein Stück Fliesspapier darauf und drückt dann mit dem Finger oder einem Falzbein oder dergl. die Schnitte fest gegen den Objektträger. Darauf bestreicht man die Schnitte abermals mit der Collodiumlösung und lässt dasselbe dann an der Luft verdunsten. Ist dies geschehen, so wird der Objektträger über einer kleinen Flamme so lange erhitzt, bis das Paraffin soeben schmilzt, dann wird derselbe zur Lösung des Paraffins in Xylol getaucht.

Aus diesem können die Schnitte, wenn es sich um durchgefärbte Objekte handelt, direkt in Xylol-Canadabalsam eingeschlossen werden. Will man dieselben aber noch nachträglich färben, so muss man sie je nach der Beschaffenheit der anzuwendenden Farbstofflösung zuvor in Wasser oder Alkohol übertragen. Da nun früher gerade bei diesem Uebertragen häufig ein Loslösen der Schnitte stattfand, führe ich dasselbe jetzt in der Weise aus, dass ich die Präparate aus dem Xylol nach einander in ein Gemisch von 3 Teilen Xylol und 1 Teil Alkohol, in 90% Alkohol und in 50% Alkohol bringe und dieselben in jeder dieser Flüssigkeiten 2 Minuten oder auch beliebig länger belasse.

Ich benutze zu diesem Zwecke parallelwandige Gefässe, auf deren Boden ich an der einen kurzen Seite ein c. 1 cm hohes Korkstück festgeklemmt habe, und lege die Objektträger dann derartig in dieselben hinein, dass sie mit dem einem Ende auf dem Korkstück ruhen und dass die mit den Schnitten beklebte Seite nach unten gekehrt ist.

Aus dem 50 % Alkohol können die Präparate sodann in Wasser oder jede beliebige Farblösung übertragen werden, ohne dass ein Ablösen der Schnitte zu befürchten wäre; wenigstens ist mir ein solches bei Einhaltung obiger Vorsichtsmassregeln selbst bei Anwendung der kompliziertesten Färbungsmethoden nur äusserst selten vorgekommen; auch habe ich bei keiner der wichtigeren Tinktionsmethoden eine störende Mitfärbung des feinen Collodiumhäutchens beobachtet.

B Aufkleben mit Agar-Agar.

§ 51. *Agar-Agar* wurde von Gravis (I) zum Aufkleben von Mikrotomschnitten empfohlen. Man bereitet sich von dieser Substanz zweckmässig eine 0,1 % wässerige Lösung, die man einige Zeit nach der Mischung der Ingredienzien bis zur gleichmässigen Verteilung erwärmt, dann durch ein feines Tuch oder Glaswolle filtriert und schliesslich durch Hinzufügung einiger Kampferstückchen vor Zersetzung schützt.

Von dieser Lösung bringt man nun einen Tropfen auf einen sorgfältig gereinigten Objektträger, legt auf diesen Tropfen die Mikrotomschnitte und erhitzt, bis das Paraffin weich wird, ohne eigentlich völlig zu schmelzen. Etwas gekrümmte Schnitte breiten sich dann völlig gleichmässig aus. Nach dem Erkalten des Objektträgers saugt man sodann das überflüssige Agar-Agar mit Fliesspapier ab und lässt völlig eintrocknen. Ist dies geschehen, so kann man, wie bei der vorigen Methode, das Paraffin mit Xylol weglösen und auch in Alkohol übertragen.

Diese Methode, die ich in letzter Zeit ebenfalls vielfach erprobt habe, hat den Vorteil, dass sie auch aufgerollte Schnitte zu verwerten gestattet; ferner werden bei derselben selbst Schrumpfungen, die bei der Einbettung entstanden sind, völlig oder wenigstens zum grössten Teil wieder ausgeglichen. Eine störende Mitfärbung des Agar-Agars beobachtete ich bisher nur bei dem Haematoxylin.

Ein Nachteil der Methode besteht aber darin, dass in reinem

Wasser vielfach eine Lösung des Agar-Agars und somit auch eine Loslösung der Schnitte eintritt. Immerhin kann man die mit Agar-Agar festgeklebten Schnitte auch nachträglich noch mit alkoholischen Lösungen oder auch mit solchen in 50 % Alkohol, bei einiger Vorsicht sogar meistens auch mit wässerigen Lösungen tingieren.

C. Kombinierte Agar-Agar-Collodium-Methode.

Eine Loslösung der mit Agar-Agar aufgeklebten Schnitte in Wasser kann man dadurch verhindern, dass man die nach der im vorigen § angegebenen Methode aufgeklebten Schnitte nach dem völligen Austrocknen noch mit der oben erwähnten Collodiumlösung (cf. § 50) bestreicht und an der Luft eintrocknen lässt. Dieser Methode habe ich mich in der letzten Zeit sehr häufig bedient, und kann sie für schwierigere Fälle nur bestens empfehlen. Sie vereinigt eben die Vorteile beider Methoden, insofern sie ein Rückgängigmachen von Kollaps ermöglicht und auch die Anwendung wässeriger Farblösungen gestattet, ohne dass eine Loslösung der Schnitte zu befürchten wäre.

D. Aufkleben mit Eiweiss.

§ 52. Nach der von P. Mayer (I u. II) herrührenden Methode benutzt man zum Aufkleben der Schnitte eine Lösung von Eiweiss. Dieselbe wird in der Weise bereitet, dass man 50 ccm Hühnereiweiss mit 50 ccm Glycerin und 1 gr Natriumsalicylat zusammenmischt und dies Gemisch nach heftigem Schütteln filtriert. Von dieser Lösung, die nach Vosseler (I, 457) nach circa einem halben Jahre ihre Brauchbarkeit verliert, bringt man einen möglichst kleinen Tropfen auf den zuvor sorgfältig gereinigten Objektträger und verreibt denselben dann derartig mit dem Finger oder einem sauberen Tuche, dass nur noch eine kaum sichtbare Schicht auf dem Objektträger zurückbleibt. Auf diese bringt man sodann die Mikrotomschnitte und drückt sie dem Objektträger fest an, indem man etwa einen trockenen Pinsel zwischen den Finger und die Schnitte hält. Werden dann die Objektträger über einer kleinen Flamme bis zum Schmelzen des Paraffins erhitzt, so haften dieselben infolge der Gerinnung des Eiweisses vollkommen fest auf dem Objektträger und man kann mit Xylol oder dergl. das Paraffin aus ihnen herauslösen, ohne dass ein Fortschwimmen derselben zu befürchten wäre. Dasselbe tritt auch nicht ein bei

direkter Ueberführung aus Xylol in Alkohol oder Alkohol in Wasser. Ebensowenig habe ich bisher bei irgend einem Farbstoffe eine störende Mitfärbung der Eiweissschicht beobachtet, und es dürfte somit diese Methode wohl für die meisten Fälle am zweckmässigsten anzuwenden sein.

9. Die Anfertigung von Dauerpräparaten.

§ 53. Um Präparate für eine möglichst lange Zeit zu konservieren, kann man sich sehr verschiedener Methoden bedienen. Die grösste Haltbarkeit dürften wohl in fast allen Fällen, die in Canadabalsam oder anderen Harzen oder Balsamen eingeschlossenen Präparate besitzen. Diese Substanzen sind aber ihrer starken Lichtbrechung wegen, die mit der der Cellulose und der meisten Einschlüsse der Pflanzenzellen nahezu übereinstimmt, fast nur für gefärbte Präparate oder solche, die für die Beobachtung im polarisierten Licht bestimmt sind, zu gebrauchen. Auch ist die Uebertragung in Balsam namentlich bei leicht kollabierenden Objekten häufig so kompliziert, dass man schon deswegen anderen Einschlussmitteln den Vorzug geben wird. Es hängt eben ganz von der Natur der einzuschliessenden Objekte ab, welches Einschlussmittel man am besten benutzt, und es wird denn auch in der zweiten und dritten Abteilung dieses Buches noch verschiedentlich zu erwähnen sein, welche Konservierungsmethode in den speziellen Fällen am meisten geeignet ist.

Da wir nun die Einschlussmethoden in Canadabalsam, Dammarlack und Terpentin bereits in den §§ 14—27 besprochen haben, so brauchen im folgenden nur noch die übrigen Einschlussarten, bei denen namentlich das Glycerin eine grosse Rolle spielt, zusammengestellt zu werden.

§ 54. *Glycerin.* Reines Glycerin in verschiedener Verdünnung oder ein Gemisch desselben mit einer Säure war früher ein sehr beliebtes und fast allgemein angewandtes Einschlussmittel. Es ist jedoch bei Anwendung desselben namentlich darauf zu achten, dass das verwandte Glycerin nicht durch zu langes Stehenlassen an der Luft verdünnt ist, da sonst ein allmähliches Eintrocknen der Präparate stattfindet, wenn der später anzulegende Lackring (cf. § 62) nicht völlig luftdicht schliesst. Konzentriertes Glycerin ist nun allerdings in vielen Fällen seiner zu stark aufhellenden und wasserentziehenden Wirkung halber nicht zu ver-

wenden. In dieser Beziehung bietet eine mit einigen Tropfen *Essigsäure* versetzte verdünnte Glycerinlösung grosse Vorteile, dieselbe muss aber, wie bereits bemerkt wurde, mit grosser Sorgfalt gegen Verdunstung geschützt werden (cf. namentlich Dippel II, 1010).

§ 55. *Glycerin und Chromalaun.* Um Präparate von Spaltalgen oder Florideen in ihrer natürlichen Farbe zu konservieren, verwendet man nach Kirchner (I p. VII) verdünntes Glycerin, dem soviel schwefelsaures Chromoxydkali zugesetzt ist, dass die Flüssigkeit eine ganz hell bläuliche Färbung erhält.

§ 56. *Glyceringelatine.* Dieselbe wird in neuerer Zeit wohl am meisten angewandt und bietet auch den flüssigen Glyceringemischen gegenüber in den meisten Fällen unleugbare Vorteile. Die Darstellung derselben geschieht zweckmässig, nach dem von Kaiser vorgeschlagenen Rezepte: man weicht 1 Gewichtsteil farblose Gelatine in 6 Teilen Wasser auf, setzt dann 7 Teile reines Glycerin hinzu und auf 100 gr dieser Mischung 1 gr Phenol. Sodann wird die ganze Mischung 10—15 Minuten unter stetigem Umrühren erwärmt, bis die Flüssigkeit völlig klar geworden und schliesslich durch Glaswolle oder Filtrierpapier filtriert. Dies geschieht natürlich am besten mit Hilfe eines Heisswasser-Trichters.

§ 57. Wenig empfindliche Objekte, wie Schnitte durch Holz oder dergl., können nun direkt aus Wasser in Glyceringelatine übertragen werden; bei zarteren Präparaten empfiehlt es sich jedoch, dieselben erst in Glycerin zu bringen. Dies wird bei Objekten, die leicht kollabieren zweckmässig in der Weise ausgeführt werden können, dass man dieselben zunächst in eine 10% Glycerinlösung überträgt und diese sich dann durch Stehenlassen an der Luft allmählich konzentrieren lässt.

§ 58. Da aber ferner die Glyceringelatine bei gewöhnlicher Temperatur fest ist, muss dieselbe vor dem Gebrauch bis zum Flüssigwerden erwärmt werden; man bedient sich hierzu zweckmässig des Paraffinofens (§ 47). Uebrigens kann man auch in der Weise verfahren, dass man sich aus der Glycerin-Gelatine kleine würfelförmige Stücke anfertigt, von denen je eines für ein gewöhnliches Präparat ausreicht, und diese dann auf dem Objektträger erwärmt. Man kann sich solche Glyceringelatinewürfel leicht darstellen, wenn man eine grössere Menge der genannten Substanz in dünner Schicht, etwa auf einem Teller, erstarren lässt und dann zerschneidet.

§ 59. Befinden sich innerhalb des in Glyceringelatine eingeschlossenen Präparates störende *Luftblasen*, so kann man dieselben bei nicht allzu empfindlichen Objekten leicht dadurch entfernen, dass man die Glyeringelatine zum Sieden erhitzt.

Da die in Glyceringelatine eingeschlossenen Präparate bei längerem Aufbewahren meist ziemlich stark beschlagen, ist es im allgemeinen empfehlenswert, dieselben mit einem Lackring zu versehen; doch empfiehlt es sich namentlich bei dickeren Schnitten denselben erst nach einiger Zeit anzubringen, da sonst bei der nachherigen Konzentration der Glyceringelatine leicht das Deckglas gesprengt wird, auch ist es so leichter durch Erwärmen etwa auftretende Luftblasen zu entfernen. Bei Demonstrations-Präparaten verfahre ich jetzt meistens so, dass ich sie erst nach einem Jahre mit einem Lackring versehe.

§ 60. *Einschluss in Luft.* Aschenskelette, in Wasser leicht lösliche Krystalle und dergl. wird man in vielen Fällen am besten einfach trocken aufbewahren. Um jedoch Staub abzuhalten, ist es auch in diesen Fällen nötig, die Objekte mit einem Deckglas zu bedecken; man kann dasselbe zweckmässig durch Umrandung mit Wachs oder Paraffin oder auch mit gummierten Papier auf dem Objektträger festkleben.

§ 61. Die *Beobachtung krystallinischer Niederschläge* und dergl. findet bei gewöhnlichem Lichte meist am besten in Luft statt, während im *polarisierten* Licht die Interferenzfarben am reinsten beim Einschluss in stark lichtbrechende Medien, wie Canadabalsam, hervortreten. Man kann sich nun leicht für beide Fälle instruktive Präparate anfertigen, wenn man auf den betreffenden Objekträger einen so kleinen Tropfen Canadabalsam bringt, dass derselbe nach dem Auflegen des Deckglases nur einen Teil des unter diesem befindlichen Raumes ausfüllt, so dass also ein Teil der Krystalle in Luft bleibt. Um störende Agentien möglichst auszuschliessen, kann man dann schliesslich noch den Rand des Deckglases mit Paraffin oder Wachs umziehen.

§ 62. *Verschlussmittel.* Von den zahlreichen von den verschiedenen Autoren in Vorschlag gebrachten Verschlussmitteln sei an dieser Stelle zunächst der sogenannte *Gold-size* erwähnt, derselbe ist für Glycerin- und Glyceringelatine-Präparate sehr geeignet. Da die Darstellungsweise desselben jedoch ziemlich umständlich ist, wird man ihn am zweckmässigsten im fertigen Zustande beziehen (z. B. von Dr. G. Grübler, Leipzig).

Sehr geeignet sind übrigens für Glyceringelatine - Präparate auch *Canadabalsam*, *Asphaltlack* oder *Maskenlack* N. III. Einen sehr zuverlässigen Verschluss gewährt auch der von Heydenreich empfohlene Bernstein enthaltende Deckglaskitt; doch darf derselbe nicht, wie ein früher von Dr. G. Grübler geliefertes Präparat, mit Eosin gefärbt sein, weil dieses allmählich in die Glyceringelatine übertritt und eine unliebsame Färbung der Präparate bewirken kann.

II. Abteilung.

Mikrochemie.

A. Anorganische Verbindungen.

1. Sauerstoff O_2.

§ 63. Zum mikrochemischen Nachweis von Sauerstoff kann die von Engelmann (I) erdachte *Bakterienmethode* in vielen Fällen mit bestem Erfolg angewandt werden. Dieselbe gründet sich darauf, dass die in Bewegung begriffenen Bakterien ihre Bewegung sofort einstellen, wenn ihnen der Sauerstoff entzogen wird, während sie dieselbe bei nachherigem Sauerstoffzutritt momentan wieder beginnen. Ausserdem wirkt der Sauerstoff aber auch derartig auf die Bewegungs*richtung* der Bakterien ein, dass sie sich nach der sauerstoffreicheren Flüssigkeit hinbewegen.

Man kann sich hiervon leicht überzeugen, wenn man einen Tropfen einer bewegliche Bakterien enthaltenden Flüssigkeit auf einen Objektträger bringt und mit einem grossen Deckgläschen bedeckt. In kurzer Zeit ist dann aller Sauerstoff in der Kulturflüssigkeit aufgezehrt und nur am Rande des Deckglächens oder um etwa im Präparat vorhandene Luftblasen — diese sind besonders instruktiv — herum, dauert die Bewegung noch lange Zeit fort. Man bemerkt auch bald, wie an diesen Orten eine grosse Anhäufung von Bakterien stattfindet.

Die Empfindlichkeit dieser noch sehr geringe Mengen von Sauerstoff anzeigenden Reaktion ist nun natürlich in gewissem Grade abhängig von der Wahl der Bakterien. Sehr brauchbar sind z. B. die Bakterien, die man erhält, wenn man halbierte Erbsen in Wasser faulen lässt. Nach wenigen Tagen treten dann in der Flüssigkeit zahllose Bakterien auf, die man gewöhnlich als Bacterium thermo bezeichnet.

Bezüglich der Ausführung der Reaktion sei noch bemerkt, dass es sich im allgemeinen empfiehlt, *grosse* Deckgläschen zu verwenden, deren Rand man zweckmässig mit Cacaobutter, Wachs oder Paraffin bestreicht, um ein Verdunsten der Flüssigkeit und den Zutritt von Sauerstoff zu verhindern.

2. Wasserstoffsuperoxyd H_2O_2.

§ 64. Um lebende Spirogyren auf die Anwesenheit von Wasserstoffsuperoxyd zu prüfen, verwandte Bokorny (III) folgende beiden Methoden.

Die erstere beruht auf der Thatsache, dass Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Eisenvitriol aus Jodkalium sofort Jod frei macht, das etwa vorhandene Stärke oder Kleister blau färbt. Er brachte somit stärkehaltige Spirogyrazellen in eine sehr verdünnte Lösung von Eisenvitriol und Jodkalium und schloss aus dem Unterbleiben der Blaufärbung der Stärkekörner auf die Abwesenheit von Wasserstoffsuperoxyd, um so mehr, da in solchen Fäden, die zuvor mit Wasserstoffsuperoxyd getränkt waren, sofort intensive Bläuung der Stärke eintrat.

Bei der zweiten Methode ging Bokorny davon aus, dass eisenbläuender Gerbstoff durch Eisenvitriol bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd sofort blau gefärbt wird, während diese Blaufärbung sonst erst nach längerer Zeit infolge der allmählichen Oxydation des Eisenvitriols durch die Luft stattfindet. Verf. beobachtete nun, ganz dem Obigen entsprechend, dass Spirogyrafäden, die einen eisenbläuenden Gerbstoff enthielten, sich nach dem Einlegen in Eisenvitriollösung erst nach vielen Stunden blau färbten, während bei den mit Wasserstoffsuperoxyd getränkten Spirogyren die Blaufärbung sofort eintrat.

Von Pfeffer (IV, 446) wurde nun übrigens die Beweiskraft dieser Versuche in Frage gestellt und namentlich bezweifelt, dass die von Bokorny verwandten verdünnten Reagentien wirklich von den lebenden Zellen aufgenommen würden. Bokorny (I und II) hat jedoch neuerdings Beobachtungen angestellt, aus denen hervorgeht, dass das Eisenvitriol in der That von den lebenden Zellen aufgenommen wird, und es kann somit die Beweiskraft der zweiten Reaktion nicht bezweifelt werden.

§ 65. Pfeffer (IV) kam denn auch durch ausgedehntere Untersuchungen ebenfalls zu dem Resultate, dass Wasserstoffsuper-

oxyd innerhalb der lebenden Pflanzenzellen nicht vorkommt. Er zeigte zunächst, dass Wasserstoffsuperoxyd ohne Schaden von den lebenden Zellen aufgenommen werden kann und dass dasselbe in vielen Fällen bereits in sehr geringer Menge deutlich sichtbare Reaktionen in denselben hervorruft, die sonst innerhalb der lebenden Zellen nicht stattfinden.

Pfeffer benutzte zu diesen Versuchen zunächst solche Pflanzen, bei denen durch die oxydierende Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds eine Färbung des zuvor farblosen Zellsaftes bewirkt wird, wie z. B. die Epidermiszellen von Stengel und Wurzel der Keimpflanzen von Vicia Faba oder die Wurzelhaare von Trianea bogotensis. Bei diesen erzeugt das Wasserstoffsuperoxyd eine Braunfärbung des Zellsaftes, auf die meist eine Ausscheidung rotbrauner oder fast schwarzer körniger Massen folgt, wie z. B. in Fig. 17 dargestellt ist; in derselben ist ein Stück einer Epidermiszelle aus dem Stengel von Vicia Faba abgebildet, die 5 Stunden lang in einer Wasserstoffsuperoxydlösung gelegen hatte, die durch Vermischen von 10 Teilen H_2O und 1 Teil einer bereits 1/2 Jahr alten käuflichen Wasserstoffsuperoxydlösung hergestellt war.



Fig. 17. Stück einer Epidermiszelle des Stengels von Vicia Faba 6 Stunden nach dem Einlegen in Wasserstoffsuperoxydlösung.

§ 66. Sodann operierte Pfeffer auch mit solchen Zellen, die von Natur einen gefärbten Zellsaft besitzen, wie z. B. die Staubfädenhaare von Tradescantia virginica. Bei diesen wird der blaue Zellsaft durch Wasserstoffsuperoxyd entweder ganz entfärbt oder nimmt eine gelbbräunliche oder weingelbe Färbung an.

Eine Entfärbung durch das aufgenommene Wasserstoffsuperoxyd konnte ferner auch bei solchen Zellen beobachtet werden, deren Plasmakörper zuvor durch *Cyanin* blau gefärbt war. Es eignen sich zu diesen Versuchen namentlich die Wurzelhaare von Trianea bogotensis, in deren Plasmakörper innerhalb einer mässig verdünnten Cyaninlösung, die durch Erwärmen des genannten Farbstoffes mit Wasser dargestellt war, nach 3—15 Minuten verschiedene blaue Differenzierungen sichtbar wurden, die durch Wasserstoffsuperoxyd in weniger als einer Minute wieder entfärbt wurden.

§ 67. Bezüglich der angewandten Lösungen von Wasser-

stoffsuperoxyd sei erwähnt, dass Pfeffer meist mit Lösungen von 0,01 — 1 % operierte. Da ferner das käufliche Wasserstoffsuperoxyd der grösseren Haltbarkeit halber stets etwas freie Salzsäure enthält, musste dasselbe zunächst mit Natriumbikarbonat neutralisiert werden und zwar setzte Pfeffer dieses stets in einem geringen Ueberschusse zu.

3. Schwefel S.

§ 68. Der in verschiedenen Bakterien in Form stark lichtbrechender Kugeln, auftretende Schwefel (cf. Fig. 18, 1 a—c) ist nach Cohn (I, 178) unlöslich in Wasser und Salzsäure, aber löslich in einem Ueberschuss von absolutem Alkohol, in heissem Kali oder schwefligsaurem Natron; Salpetersäure und chlorsaures Kali lösen dieselben schon bei gewöhnlicher Temperatur, ebenso Schwefelkohlenstoff, doch muss dem Letzteren der Eintritt in die Bakterienzellen durch vorhergehende Tödtung derselben durch Schwefelsäure oder Eintrocknenlassen ermöglicht werden. Nach Winogradsky (I, 521) ist diese Löslichkeit in Schwefelkohlenstoff übrigens keine vollständige, der in dem genannten Reagenz unlösliche Rückstand war jedoch stets nur gering. Nach Bütschli (I, 6) sollen die Schwefelkörper ferner innerhalb 24 Stunden in künstlichem Magensaft, sowie in 10 % Sodalösung löslich sein.

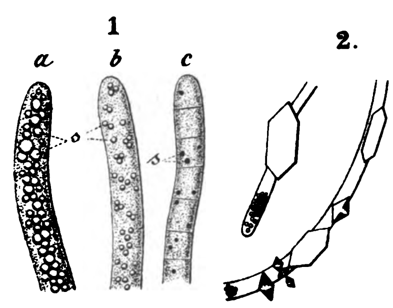


Fig. 18. 1. Beggiatoenfäden, a sehr schwefelreich, b nach 24-, c nach 48-stündiger Kultur in Brunnenwasser. s Schwefelkörper. 2. Id. 24 Stunden nach der Behandlung mit Pikrinsäure, die Schwefelkugeln sind zum grössten Teil in Krystalle verwandelt. Nach Winogradsky.

§ 69. Ueber den Aggregatzustand der Schwefelkörper geben verschiedene Beobachtungen von Winogradsky (I, 518) Aufschluss. Nach diesen besitzen dieselben in der lebenden Zelle stets vollkommene Kugelgestalt und fliessen beim Tödten derselben, so z. B. beim Erhitzen auf 70° C, zu grossen Tropfen zusammen, die sich häufig in schöne Schwefelkrystalle verwandeln. Diese Krystallisation trat am besten ein, wenn schwefelreiche Beggiatoa-Fäden ungefähr 1 Minute lang in konzentrierte wässerige Pikrinsäurelösung getaucht und dann mit viel Wasser ausgewaschen waren. An solchen Fäden waren schon

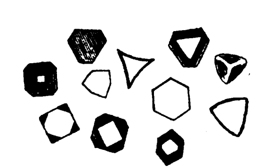
nach 24 Stunden schön ausgebildete Schwefelkrystalle sichtbar, die teils monokline Prismen, teils rhombische Octaëder darstellten (cf. Fig. 18, 2). Es ist somit anzunehmen, dass diese Schwefelkörper aus der bei gewöhnlicher Temperatur halbflüssigen oder ölartigen Modifikation des Schwefels bestehen. In der That zeigte der Schwefelniederschlag, der auf Zusatz von verdünnter Salzsäure zu einer Lösung von Calciumpentasulfid entsteht, bei der mikroskopischen Beobachtung ganz das gleiche Verhalten, wie die Schwefelkörper der Beggiatoen. Möglich ist es übrigens nach Winogradsky, dass diese ebenso wie die Schwefelkugeln der Schwefelmilch allmählich in den festen Aggregatzustand übergehen und dass namentlich bei langsam vegetierenden Fäden alle Uebergänge vom flüssigen zum nahezu festen Zustande vorkommen.

§ 70. Erwähnen will ich an dieser Stelle auch die von Jönsson (I) in einem Mycel von Penicillium, das auf verdünnter Schwefelsäure gewachsen war, beobachteten stark lichtbrechenden Körper, die in vielen Reaktionen mit den Schwefelkörpern der Beggiatoen übereinstimmen und nach Jönsson aus einem Gemisch von Schwefel und einer ölartigen Substanz bestehen sollen.

4. Salzsäure HCl und deren Salze.

§ 71. Zum Nachweis der Chlorwasserstoffsäure fand Schimper (II, 212) namentlich folgende beiden Methoden geeignet.

I. Zusatz von *Silbernitrat* bewirkt die Bildung von *amorphem* Chlorsilber, man kann dasselbe aber im krystallinischen Zustande erhalten, wenn man den durch Zusatz von Silbernitrat entstandenen Niederschlag in einer möglichst geringen Menge von Ammoniak löst und die Flüssigkeit dann verdunsten lässt. Es bilden sich dann reguläre Krystalle von Chlorsilber, die vorwiegend aus dem Hexaëder, Octaëder und Rhombendodekaëder, sowie Kombinationen derselben bestehen (cf. Fig. 19). Diese Krystalle färben sich am Licht nur allmählich violett; bei Gegenwart reduzierender Pflanzensäfte tritt dagegen häufig eine sehr schnelle Färbung der Krystalle ein.


Fig. 19. Krystalle von Chlorsilber nach Haushofer.

Ausserdem kann das gebildete Chlorsilber auch noch durch seine leichte Löslichkeit in Cyankalium, Natriumhyposulfit und in konzentrierter Lösung von Quecksilbernitrat geprüft werden. Ferner ist das Chlorsilber etwas lös-

lich in den konzentrierten Lösungen der Alkalimetalle und konzentrierter Salzsäure und es kann somit auch das Silberchlorid nach der Borodin'schen Methode[1]) mit einer konzentrierten Lösung von Chlorsilber in konzentrierter Salzsäure oder Kochsalzlösung geprüft werden.

II. *Thalliumsulfat* bewirkt sofort oder wenigstens beim Verdunsten die Bildung von regulären Octaëdern oder verschiedenartig gestalteten Skeletten von Thalliumchlorid, die nach der Borodin'schen Methode mit einer konzentrierten Lösung von Thalliumchlorid geprüft werden können.

5. Schwefelsäure $SO_2(OH)_2$ und deren Salze.

§ 72. Zum Nachweis der Schwefelsäure fehlt es zur Zeit noch an einer völlig zuverlässigen Methode. Von Schimper (II, 219) wurden folgende Methoden angewandt:

1. *Baryumchlorid* bewirkt stets Fällung von Baryumsulfat, dasselbe ist aber nur selten krystallinisch und das positive Ergebnis daher selten ganz sicher.

2. *Strontiumnitrat* bewirkt die Bildung kleiner dicker Krystalle von meist rundlich-rhombischen, zuweilen aber scharfen und geradlienigen Umrissen, die in Wasser unlöslich sind.

3. *Kaliumsulfat* krystallisiert aus der in Wasser gelösten Asche häufig in Form hexagonaler Krystalltäfelchen aus, die bei Zusatz von Baryumchlorid in farblose Körnchen, bei Zusatz von Platinchlorid aber in einen Haufen rother Körnchen zerfallen.

---

1) Nach der von Borodin (II, 805) herrührenden Methode wird ein beliebiger in Wasser löslicher Niederschlag mit einer völlig gesättigen Lösung derjenigen Substanz, die man in derselben vermutet, geprüft; ist die Vermutung richtig, so wird sich der betreffende Niederschlag natürlich nicht auflösen, während jede andere Substanz, wenn nicht irgendwelche Umsetsungen eintreten, darin löslich sein wird. Haben wir es z. B. mit einem Gemisch von Asparagin und Salpeter zu thun, so werden in einer konzentrierten Asparaginlösung natürlich die Asparaginkrystalle unlöslich sein, die Salpeterkrystalle dagegen gelöst werden; bei nachherigem Wasserzusatz werden aber auch die Asparaginkrystalle aufgelöst werden. Ebenso wird auch in dem obenerwähnten Falle das Chlorsilber in einer konzentrierten Lösung von Chlorsilber in konzentrierter Salzsäure (oder NaCl) unlöslich sein, während es sich bei einem Zusatz von weiterer Salzsäure (resp. NaCl-Lösung) auflösen muss. Bei nicht allzu leicht löslichen Substanzen leistet diese Methode in der Mikrochemie vortreffliche Dienste; doch muss man vor allem dafür Sorge tragen, dass die angewandten Lösungen auch wirklich völlig gesättigt sind, und dass sie nicht etwa durch Temperaturveränderungen befähigt werden, noch mehr von der betreffenden Substanz zu lösen.

4. *Natrium*- und *Kaliumsulfut* können in den lebenden Geweben häufig mit Nickelsulfat nachgewiesen werden. Sie bilden mit diesem wohl krystallisierende Doppelsalze von der Zusammensetzung: $NiSO_4 + Na_2SO_4 + 6H_2O$ (resp. $NiSO_4 + K_2SO_4 + 6H_2O$); dieselben treten meist in der Form des monoklinen Prismas mit der Basis kombiniert auf, sind allerdings ziemlich leicht löslich in Wasser.

6. Salpetersäure NO_2OH, salpetrige Säure NOOH und deren Salze.

§ 73. Zum mikrochemischen Nachweis der *Nitrate* wurde von Molisch (I) zuerst das *Diphenylamin* empfohlen und zwar benutzte derselbe für *frische* Schnitte eine Lösung von $^1/_{100}$ bis $^1/_{10}$ gr Diphenylamin in 10 ccm reiner konzentrierter Schwefelsäure, für *eingetrocknete* Schnitte eine konzentrierte Lösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure. Bei Gegenwart von Nitraten tritt nach Zusatz dieses Reagenz momentan eine tiefblaue Färbung ein, die nach einiger Zeit verschwindet oder in braungelb übergeht.

Diese Reaktion tritt nun aber in gleicher Weise auch bei Gegenwart von *Nitriten* ein, und es kann dieselbe somit nur dann zum Nachweis von Nitraten dienen, wenn die Abwesenheit salpetrigsaurer Salze nachgewiesen ist. In der That haben nun aber alle diesbezüglichen Untersuchungen bisher zu dem Resultate geführt, dass salpetrigsaure Salze innerhalb der lebenden Pflanze nicht vorkommen, und es ist somit dieses Bedenken gegen die Anwendbarkeit des Diphenylamins als Reagenz auf Nitrate, soweit es sich um die mikrochemische Untersuchung des Pflanzenkörpers handelt, hinfällig.

Sodann ist jedoch zu erwähnen, dass auch andere Verbindungen als Nitrate und Nitrite, wie z. B. Mangansuperoxd, chromsaures Kali, chlorsaures Kali, Wasserstoffsuperoxyd, Eisenoxyd und dessen Salze, ebenfalls die gleiche Reaktion geben (cf. Frank I u. II und Kreusler I); allerdings scheinen derartige Stoffe innerhalb der Pflanze ebensowenig vorzukommen, wie Nitrite; wenigstens geben nitratfrei gezogene Pflanzen nach übereinstimmenden Versuchen von Frank und Schimper (II, 217) niemals Blaufärbung mit Diphenylamin.

Wichtiger ist nun aber, dass die Reaktion bei Gegenwart ver-



schiedener Stoffe wie z. B. verholzter Zellmembranen auch bei Anwesenheit reichlicher Mengen von Nitraten gänzlich ausbleiben kann (cf. Schimper II, 217). Es folgt hieraus, dass bei einem negativen Resultate keineswegs immer auf die Abwesenheit von Nitraten geschlossen werden kann.

§ 74. *Brucin* gibt mit Nitraten und Nitriten eine hochrote oder rotgelbe Färbung, die aber allmählich wieder verschwindet. Molisch (VI, 152) verwendet zu mikrochemischen Zwecken eine Lösung, die 0,2 gr Brucin in 10 cc konzentrierter Schwefelsäure enthält, bemerkt jedoch, dass diese Reaktion der Diphenylaminreaktion an Schärfe nachsteht.

§ 75. Nach Arnaud und Padé (I) kann zum mikrochemischen Nachweis der Nitrate auch das aus der Rinde von Remijia purdieana gewonnene Alkaloid *Cinchonamin* ($C_{19}H_{24}N_2O$) dienen, dessen Nitrat in angesäuertem Wasser fast absolut unlöslich ist und schöne leicht erkennbare Krystalle bildet, deren Gestalt von den genannten Autoren leider nicht beschrieben wird. Dieselben tauchen frische Schnitte von den zu prüfenden Pflanzenteilen direkt in eine 0,4% Lösung von salzsaurem Cinchonamin, die mit Salzsäure schwach angesäuert ist. Die Krystalle des salpetersauren Cinchonamins sollen sich dann im Innern der nitrathaltigen Zellen abscheiden.

§ 76. *Kalinitrat* (NO_3K) kann auch in der Weise nachgewiesen werden, dass man die betreffenden Schnitte nach Bedeckung mit einem Deckgläschen und Zusatz von Alkohol austrocknen lässt; der Salpeter krystallisiert dann meist zum grössten Teile in Form von rhombischen Tafeln aus (cf. Fig. 27, § 130), die namentlich im polarisiertem Licht scharf hervortreten. Aehnliche Krystalle bildet auch das Asparagin; dieselben lassen sich aber durch Winkelmessung leicht von den Salpeterkrystallen unterscheiden (cf. § 130). Ausserdem sind die Letzteren natürlich in konzentrierter wässeriger Asparaginlösung leicht löslich und werden durch Erhitzen nicht zerstört. Auch können dieselben leicht noch mit Diphenylaminlösung geprüft werden. Die Borodin'sche Methode (cf. § 71 Anm.) ist dagegen der leichten Löslichkeit des Kalisalpeters wegen nicht anwendbar.

7. Phosphorsäure $PO(OH)_3$ und deren Salze.

§ 77. Zum mikrochemischen Nachweis der Phosphorsäure sind namentlich folgende beiden Reaktionen geeignet:

I. *Salpetersäure und molybdänsaures Ammon.* Dieses zuerst von Hansen (I, 96) in die botanische Mikrochemie eingeführte Reagenz bewirkt mit Phosphaten die Bildung regulärer Krystalle, die meist eine Kombination von Octaëder und Würfel darstellen und intensiv gelb gefärbt sind. Eine Verwechslung derselben mit der isomorphen Arsensäureverbindung ist, wenn es sich um Untersuchung pflanzlicher Objekte handelt, gewöhnlich ausgeschlossen.

Man benutzt zweckmässig als Reagenz eine Lösung, die auf 1 gr molybdänsaures Ammon 12 ccm der offizinellen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,18 enthält. Bei Gegenwart geringer Säuremengen bildet sich der Niederschlag erst bei gelindem Erwärmen (auf 40—50°) und häufig auch erst nach längerer Zeit.

Die zu prüfenden Schnitte werden übrigens vor dem Zusatz des Reagenz am besten verascht, da sonst die Gegenwart gewisser organischer Substanzen, wie z. B. weinsteinsauren Kalis, die Reaktion verhindern kann. Auch die an das Nukleïn oder sonstwie organisch gebundene Phosphorsäure, wie z. B. die in den Globoiden enthaltene gepaarte Phosphorsäure, wird durch das obige Reagenz direkt nicht angezeigt, sondern nur in der Asche (cf. Schimper II, 215). Man kann nun das obengenannte Reagenz direkt der durch Glühen auf dem Deckglase dargestellten Asche zusetzen. So erhält man z. B. mit der Asche von Schnitten durch *nicht zu junge* Stengel von Stapelia picta sofort eine intensive Reaktion, während dieselbe bei direkter Behandlung der aus Alkoholmaterial dargestellten Schnitte, in denen Sphaerite von Calciumphosphat enthalten sind (cf. § 96), erst nach einigen Stunden eintrat.

II. Zusatz von *Magnesiumsulfat* und *Chlorammonium* erzeugt mit phosphorsauren Salzen einen krystallinischen Niederschlag von phosphorsaurer Ammonmagnesia, der in Ammoniak- und Chlorammoniumlösung so gut wie unlöslich ist. Diese Krystalle, von denen einige der charakteristischsten in Fig. 20 nach Haushofer (I, 92) abgebildet sind gehören dem rhombischen Systeme an. Ein ähnliches Salz wird übrigens auch von der Arsensäure gebildet.

Ein geeignetes Reagenz erhält man z. B. durch Vermischen

von 25 Volumen konzentrierter wässeriger Magnesiumsulfatlösung, 2 Volumen konzentrierter wässeriger Chlorammoniumlösung und 15 Volumen Wasser. Bringt man z. B. in diese Lösung Schnitte durch Alkoholmaterial von Stengeln von Stapelia picta, die man zuvor, um eine Niederschlagbildung durch Alkohol zu vermeiden, für kurze Zeit in Wasser getaucht hat, so bilden sich nach einiger Zeit in der unmittelbaren Umgebung der Chalciumsphosphatsphaerite unter allmählicher Lösung derselben wohl ausgebildete Krystalle von phosphorsaurer Ammonmagnesia, unter denen mir namentlich X förmige Skelette charakteristisch zu sein schienen. Durch Erwärmen liess sich diese Reaktion zwar beschleunigen, doch entstanden dann weniger regelmässig ausgebildete Krystalle.

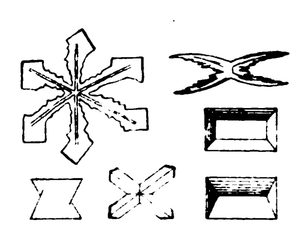


Fig. 20. Krystalle von Magnesium-Ammoniumphosphat, nach Haushofer.

Zum Nachweis der Phosphorsäure innerhalb der Gewebe ist diese Reaktion nach Schimper (II, 216) der zuvor beschriebenen vorzuziehen, da sie durch die Anwesenheit von organischen Verbindungen nicht beeinträchtigt wird und ebenfalls sehr empfindlich ist.

8. Kieselsäure SiO_2 und Silikate.

§ 78. Kieselsäure findet sich in der Pflanzenwelt teils als Inkrustation der Zellenmembran, teils in Form verschiedenartig gestalteter Kieselkörper im Innern der Zellen (cf. die Zusammenstellung von Kohl II, 197).

Zum mikrochemischen Nachweis der Kieselsäure kann man zunächst die Eigenschaft derselben benutzen, durch *Glühen* nicht verändert zu werden. Zur Abtrennung von den übrigen anorganischen Substanzen kann sodann die Unlöslichkeit der Kieselsäure in allen Säuren mit Ausnahme der Flusssäure dienen. Bei einigermassen kieselsäurereichen Organen ist es nun durch kombinierte Wirkung von Säuren und Glühen möglich, vollkommen zusammenhängende Kieselsäuremembranen, sogenannte *Kieselskelete* zu erhalten. Von den durch besonderen Kieselsäurereichtum ausgezeichneten Membranen der Diatomeen oder von der Epidermis der Gramineen oder Equisetaceen erhält man z. B. sehr schöne Kieselskelette, wenn man dieselben nach der von Sachs

vorgeschlagenen Methode mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf einem Deckgläschen oder, um das Ankleben der Schnitte zu verhindern, auf einem Glimmerplättchen so lange erhitzt, bis die nach der Verdampfung der Schwefelsäure restierende Asche vollkommen weiss geworden ist.

Bei kieselsäureärmeren Objekten gelingt es jedoch meist nicht nach dieser durch grosse Einfachheit ausgezeichneten Methode geeignete Kieselskelette zu erhalten. Man verfährt dann meist besser in der Weise, dass man aus den betreffenden Schnitten vor dem Glühen durch Behandlung mit Salzsäure oder Salpetersäure die löslichen anorganischen Substanzen entfernt. Man erhält so bedeutend leichter rein weisse Skelette, die man eventuell durch nochmalige Behandlung mit Salzsäure von fremdartigen Beimengungen reinigen kann.

§ 79. Ausserdem kann man nun aber Kieselskelette auch sehr gut ganz *auf feuchtem Wege* darstellen, dadurch dass man die betreffenden Objekte nach der von Miliarakis (I) vorgeschlagenen Methode zunächst in einem Becherglase mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt, bis sie vollständig geschwärzt sind und dann eine 20% wässerige Chromsäurelösung zusetzt. Es werden in diesem Gemische auch die verkorkten Membranen völlig zerstört, nur die Kieselskelette bleiben zurück, die nach Wasserzusatz leicht durch Dekantieren isoliert und durch wiederholtes Auswaschen mit Wasser und Alkohol völlig gereinigt werden können. Die so gewonnenen Kieselskelette der Diatomeen zeigen namentlich bei der Beobachtung in Luft die feinsten Strukturverhältnisse dieser Membranen.

Nach Kohl (II, 226) ist diese Methode übrigens nur bei Anwesenheit reichlicher Kieselsäuremengen anwendbar. Der genannte Autor erhielt bei Pflanzenteilen mit geringerem Kieselsäuregehalt, die beim Behandeln mit Chrom-Schwefelsäure völlig aufgelöst wurden, durch Glühen noch zarte Kieselskelette. Bei anderen Pflanzenteilen konnte der Kieselsäuregehalt nur in der Asche mit Hilfe der Kieselfluornatriumreaktion (cf. § 81) nachgewiesen werden.

§ 80. Um nun die nach einer dieser Methoden dargestellten Skelette auf ihren Kieselsäuregehalt zu prüfen, verwendet man zweckmässig *Flusssäure*, in der sich reine Kieselskelette vollständig auflösen müssen.

Kärner (I, 262) empfiehlt zu diesem Zwecke eine verdünnte wässerige Lösung von Flusssäure, die, da sie das Glas angreifen

würde, in einer Kautschuk- oder Bleiflasche aufbewahrt werden und mit einem Platindraht oder Kautschukstäbchen auf die zu untersuchenden Objekte gebracht werden muss. Die als Unterlage benutzten Objektträger müssen natürlich auch vor der Einwirkung der Flusssäure geschützt werden; es wurde zu diesem Zwecke Bestreichen mit Canadabalsam, Leim, Vaselin oder Glycerin empfohlen, nach Kärner (I, 262) ist es jedoch am zweckmässigsten, die zu benutzenden Objektträger mit einem Stücke von durchsichtigem Wachsbarchentstoffe zu bedecken, derselbe soll zuvor durch Reiben zwischen beiden Händen etwas erwärmt und geglättet werden. An Stelle eines Deckglases empfiehlt der genannte Autor Gelatinepapier zu verwenden; ein Blättchen von der gleichen Substanz klebt derselben mittelst Canadabalsam auf das Objektiv, um dasselbe gegen die Flusssäuredämpfe zu schützen.

Wenn nun Kärner (I, 266) die Flusssäure auf die nicht zuvor mit Säuren oder dergl. behandelten Membranen einwirken liess, so beobachtete er meist nur eine partielle Lösung der Kieselsäure. Ob dies auf physikalische Wirkung der übrigen Membranbestandteile oder auf chemische Bindung, etwa auf eine Verbindung von Silicium und Cellulose, zurückzuführen ist, lässt sich zur Zeit noch nicht entscheiden.

§ 81. Ausser der Löslichkeit in Flusssäure kann man nun ferner noch die Bildung von *Kieselfluornatrium*-Krystallen zum Nachweis der Kieselsäure benutzen, die in Wasser sehr schwer löslich sind. Um diese Krystalle zu erhalten, setzt man am zweckmässigsten der Asche Flusssäure und etwas Natriumchlorid zu und lässt langsam verdunsten. Die dann bei Gegenwart von Silicium entstehenden Kieselfluornatriumkrystalle gehören dem hexagonalen Systeme an und stellen meist Kombinationen von Prismen und Pyramiden oder auch sechsseitige Tafeln dar; in stärkeren Lösungen wurden auch sechsstrahlige Sterne und Rosetten als Skelettformen beobachtet (Haushofer I, 98).

9. Kalium K.

§ 82. Da in der Asche Ammonium ausgeschlossen ist, kann *Platinchlorid* sehr gut zum Nachweis des Kaliums dienen; das entstehende Kaliumplatinchlorid krystallisiert in regulären Oktaëdern und Würfeln. Die Asche wird nach Schimper (II, 213) in einem Tropfen angesäuerten Wassers gelöst, bis zum Trocknen erwärmt und das Reagenz vor oder nach dem Erkalten zugesetzt.

Mit besonderer Sorgfalt ist jedoch das anzuwendende Reagenz vorher darauf zu prüfen, ob es auch wirklich ganz kalifrei ist, es kann dies in der Weise geschehen, dass man einen Tropfen des Reagenz langsam auf dem Objektträger verdunsten lässt.

10. Natrium Na.

§ 83. Zum Nachweis sehr geringer Natriummengen bedient man sich zweckmässig des von Streng (I) vorgeschlagenen *Uranylmagnesiumacetats;* dasselbe bildet mit Natrium ein Doppelsalz von der Zusammensetzung: $CH_3CO_2Na + (CH_3CO_2)_2UO_2 + (CH_3COO)_2Mg + (CH_3COO)_2UO + 9\ H_2O$. Diese sehr natriumarme und also auch schon bei der Gegenwart sehr geringer Natriummengen auftretende Verbindung bildet farblose oder ganz schwach gelbliche rhomboëdrische Kryställchen, die schwer löslich sind in Wasser, fast unlöslich in Alkohol.

Da die Lösung des Uransalzes bei längerem Aufbewahren in Glasgefässen aus diesen Natrium aufnimmt, empfiehlt Streng (III) direkt das feste Magnesia-Uranylsalz zuzusetzen.

Von Schimper (II, 215) wurde zum Nachweis des Natriums Uranylacetat benutzt, das beim Verdunsten die Bildung scharf ausgebildeter Tetraëder von Natrium-Uranylacetat ($CH_3COONa + (CH_3COO)_2UO$) bewirkt, die bei grösseren Dimensionen schwach gelblich erscheinen. Bei Anwesenheit sehr geringer Natriummengen und gleichzeitiger Anwesenheit von Magnesia bildet sich natürlich auch hier das oben erwähnte Uranylmagnesiumnatriumacetat.

11. Ammonium NH_4.

§ 84 Zum Nachweis des Ammoniums kann nach Strasburger (I, 74) das sogenannte Nessler'sche Reagenz verwandt werden; dasselbe wird zweckmässig in folgender Weise bereitet: 2 gr Jodkalium werden in 5 ccm Wasser gelöst, dann wird unter Erwärmen so lange Quecksilberjodid zugesetzt, bis ein Teil ungelöst bleibt. Nachdem die Flüssigkeit erkaltet ist, verdünnt man mit 20 ccm Wasser, lässt einige Zeit stehen, filtriert und versetzt 20 ccm des Filtrats mit 30 ccm konzentrierter Kalilauge. Sollte die Flüssigkeit hierdurch trübe werden, so muss man nochmals filtrieren (Nickel I, 94).

Bei Gegenwart von Ammonium nimmt diese Lösung eine gelbe Farbe an, bei Gegenwart von mehr Ammoniak entsteht ein

brauner Niederschlag. Uebrigens geben auch verschiedene organische Verbindungen die gleiche Reaktion (Nickel I, 94).

12. Calcium Ca.

§ 85. Calcium findet sich innerhalb der lebenden Pflanze sehr häufig in *krystallinischer* Form und zwar bestehen diese Krystalle, die bald im Zellsaft, bald auch innerhalb der Membran angetroffen werden, meist aus Calciumoxalat, seltener wurden Krystalle von Calciumkarbonat, Gyps und Calciumtartrat beobachtet. Kohlensaurer Kalk inkrustiert ferner häufig in grossen Mengen die Zellmembranen; schliesslich wurde auch Calciumphosphat im pflanzlichen Organismus nachgewiesen. Es sollen nun im folgenden zunächst die Nachweisungsmethoden für die verschiedenen Calciumsalze zusammengestellt und dann die zum Nachweis des Calciums in der Asche und im Zellsaft dienenden Methoden besprochen werden.

a) Calciumoxalat $(COO)_2Ca$.

§ 86. Aus Calciumoxalat bestehen fast alle innerhalb der Pflanzenzellen auftretenden Krystalle; dieselben finden sich teils im Zellinhalt, teils sind sie der Membran ein oder aufgelagert. Sie gehören teils dem tetragonalen, teils dem monosymmetrischen Krystallsysteme an. Die wichtigsten Formen derselben sind in Figur 21 abgebildet. Auf derselben stellt zunächst Fig. I eine tetragonale Pyramide dar, Fig. II u. III eine Kombination von Pyramide und Prisma, Fig. IV ein monosymmetrisches Rhomboëder, Fig. V eine rhombische Tafel, Fig. VI wahrscheinlich eine Kombination von positiver und negativer Hemipyramide mit der Basis, Fig. VII eine Kombination von der rhombischen

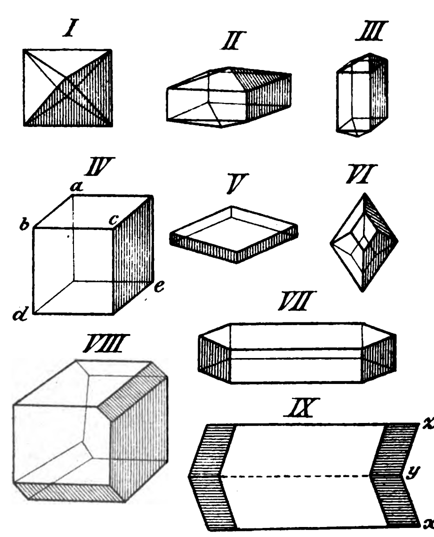


Fig. 21. Krystalle von Calciumoxalat. I—III aus dem Schwammparenchym von Tradescentia discolor. IV von Cycas circinalis. V Musa paradisiaca. VI Citrus vulgaris. VII und IX Guaiacum officinale. VIII Citrus medica. IV, V, VII—IX nach Holzner, VI nach Pfitzer.

Tafel (Fig. V) mit dem Klinopinakoid, Fig. VIII eine Kombination des Rhomboëders (Fig. IV) mit einer Hemipyramide, Fig. IX einen Zwillingskrystall, bei dem der Winkel x y z nach Holzner (I, 34) 141° 3′ beträgt. Ausserdem findet sich der oxalsaure Kalk aber auch namentlich häufig in Form feiner Nadeln (»Rhaphiden«) oder winziger Splittern (»Krystallsand«), an denen sich krystallographisch bestimmbare Flächen oder Winkel nicht mehr nachweisen lassen, auch Spharokrystalle von Calciumoxalat sind beobachtet (cf. die Zusammenstellung von Kohl (II, 15).

Der oxalsaure Kalk ist unlöslich in Wasser und *Essigsäure;* in *Salzsäure* ist derselbe dagegen löslich, doch erfolgt die Lösung grösserer Krystalle, namentlich wenn dieselben in Schleim eingebettet sind, keineswegs momentan. Man bringt die Präparate dann am besten in konzentrierte Salzsäure und verfolgt die Lösung unter dem Polarisationsmikroskop. Man kann die Wirkung der Salzsäure übrigens auch durch Erwärmen ganz bedeutend beschleunigen.

Gegen *Salpetersäure* verhält sich Calciumoxalat ungefähr ebenso wie gegen Salzsäure; es ist in derselben namentlich beim Erwärmen leicht löslich.

§ 87. Durch *Schwefelsäure* wird das Calciumoxalat in das in Wasser und Schwefelsäure wenig lösliche Calciumsulfat (Gyps) übergeführt, das sich meist in Form von Nadeln abscheidet. Eine momentane Verwandlung des Calciumoxalates in Gyps findet statt, wenn man die betreffenden Schnitte direkt in konzentrierte Schwefelsäure oder ein Gemisch von 1 Teil Wasser und 1 Teil konzentrierter Schwefelsäure bringt und bis zum Sieden oder doch bis nahe zum Sieden erhitzt. Der Gyps scheidet sich dann stets innerhalb derselben Zellen ab, die früher die Calciumoxalatkrystalle enthielten und das entstandene je nach der Grösse mehr oder weniger undurchsichtige Konglomerat von bald deutlich nadelförmigen, bald mehr körnig erscheinenden Gypsteilchen besitzt meist noch genau dieselbe Gestalt wie die ursprünglichen Krystalle. Im Polarisationsmikroskop leuchten diese krystallinischen Konglomerate stark auf.

Zur Unterscheidung von Calciumoxalat und Calciumsulfat wurde neuerdings von Kohl (II, 194) eine *Chlorbaryumlösung* vorgeschlagen, die Calciumoxalat unverändert lässt, während sich Gypskrystalle in derselben mit einer feinkörnigen Schicht von schwefelsaurem Baryt überziehen. In einem Gemisch von Chlor-

baryum und Salzsäure wird Gyps schnell in Baryumsulfat verwandelt, während die Calciumoxalatkrystalle in denselben ohne Bildung eines Niederschlages verschwinden.

Bei der Behandlung mit *Kalilauge* bleibt der oxalsaure Kalk zunächst unverändert; wie von Sanio (I, 254) zuerst beobachtet wurde, werden jedoch die Krystalle von Calciumoxalat nach einiger Zeit, meist erst nach mehreren Stunden plötzlich gelöst, und es bilden sich in der umgebenden Flüssigkeit neue Krystalle, die die Form von sechsseitigen Tafeln haben, deren chemische Zusammensetzung aber noch nicht ermittelt ist.

§ 88. Beim *Glühen* der Calciumoxalatkrystalle, das zweckmässig auf einem auf ein Platinblech gelegten Deckgläschen geschehen kann, wird der oxalsaure Kalk zunächst in kohlensauren Kalk und dann in Calciumoxyd verwandelt. Die Krystalle behalten dabei übrigens ihre ursprüngliche Gestalt vollkommen bei, werden nur undurchsichtig und erscheinen infolge dessen bei durchfallendem Lichte schwarz, bei auffallendem Lichte (resp. Dunkelfeldbeleuchtung) jedoch rein weiss. Lösen sich nun die Krystalle nach dem Glühen in verdünnter Essigsäure oder konzentrierter Salzsäure ohne Entwickelung von Gasblasen, so zeigt dies an, dass eine Verwandlung des Calciumoxalates in Calciumoxyd stattgefunden hat, während sich das Calciumkarbonat natürlich unter Entbindung von Kohlensäure in Salzsäure auflöst.

§ 89. Das Auffinden der Calciumoxalatkrystalle kann ausserdem durch die Beobachtung im *polarisierten Lichte* sehr erleichtert werden; dieselben sind nämlich sämtlich durch starke Doppelbrechung ausgezeichnet, die allerdings bei den dem monosymmetrischen Systeme angehörenden Krystallen bedeutend grösser ist, als bei denen des tetragonalen Systems; die letzteren werden natürlich, wenn ihre optische Axe vertikal steht, im Polarisationsmikroskop bei gekreuzten Nikols überhaupt nicht aufleuchten können.

Um die Calciumoxalatkrystalle innerhalb *grösserer Organe*, wie z. B. ganzer Blätter, ohne dieselben in Schnitte zu zerlegen, sichtbar zu machen, kann man dieselben zweckmässig ganz durchsichtig machen. Zu diesem Zwecke wurde bisher namentlich *Chloralhydrat* (cf. § 12, 3), das den oxalsauren Kalk nicht angreift, benutzt; ebenso kann man aber auch *Phenol* (cf. § 12, 2) anwenden. Erhitzt man die betreffenden Stücke in einer dieser Flüssigkeiten bis zum Sieden, so werden sie meist in sehr kurzer Zeit völlig aufgehellt. Auch die von Wehmer (I, 218) zur Entfärbung der

Blätter angewandte alkoholische Lösung von schwefliger Säure wird gewiss in manchen Fällen gute Dienste leisten können.

Zur *Konservierung* derartiger Präparate ist wohl Canada-Balsam am geeignetsten; aus dem Phenol können sie zu diesem Zwecke direkt in Xylol und dann in Xylol-Canadabalsam übertragen werden. Die Beobachtung geschieht natürlich bei den in dieser Weise aufgehellten Präparaten am besten im poralisierten Lichte.

b) Calciumcarbonat CO_3Ca.

§ 90. Kohlensaurer Kalk findet sich in der Pflanzenwelt nur selten im Inneren der Zellen, meist ist er der Membran ein- oder aufgelagert (cf. Zimmermann I, 104).

Um nun zunächst in dem Calciumcarbonat die *Kohlensäure* nachzuweisen, bedient man sich zweckmässig der Essigsäure oder Salzsäure; nach Zusatz derselben entweicht, wie unter dem Mikroskop direkt verfolgt werden kann, die Kohlensäure in Blasenform. Von Melnikoff (I, 30) wurde jedoch darauf hingewiesen, dass es zum Nachweiss geringer Kohlensäuremengen notwendig ist, konzentrierte Säuren [1]) anzuwenden und auch dafür zu sorgen, dass dieselben möglichst schnell zu dem zu prüfenden Körper gelangen; offenbar wird ja die frei werdende Kohlensäure um so leichter, ohne in Blasenform ausgeschieden zu werden, von dem Präparationswasser absorbiert und durch Diffusion fortgeleitet werden können, je langsamer die Abscheidung derselben erfolgt.

§ 91. Zur Nachweisung des Calciums benutzt man zweckmässig eine Lösung von *oxalsaurem Ammon,* die mit *Essigsäure* angesäuert ist.

Die Art, in der diese Lösung mit Calciumsalzen reagiert, ist jedoch in hohem Grade von der Konzentration derselben abhängig. So erhielt ich z. B. bei Schnitten durch das Blatt von Ficus elastica reichliche Mengen meist drusenartig verwachsener Krystalle innerhalb der Cystolithenzellen und in der unmittelbaren Umgebung derselben, wenn ich die betreffenden Schnitte in eine Lösung brachte, die 0,5 % oxalsaures Ammon und 1 % Essigsäure enthielt. Diese Reaktion trat sofort ein, wenn ich die Schnitte direkt in die zuvor zum Sieden erhitzte Lösung eintrug. Die so entstehenden Krystalle sind stark doppelbrechend.

---

1) Am besten ist konzentrierte Salzsäure. Konzentrierte Essigsäure ist nicht brauchbar, da sie das Calciumcarbonat langsamer löst als verdünnte.



Verwandte ich dagegen eine Lösung, die 10 % oxalsaures Ammon und 1 % Essigsäure enthielt, so wurde das oxalsaure Ammon direkt in den Cystolithen niedergeschlagen, die bei mikroskopischer Beobachtung gänzlich unverändert aussahen; nur wenn die betreffenden Schnitte in die siedende Lösung gebracht waren, zeigten die Cystolithen auf ihrer Oberfläche eine mehr oder weniger deutliche körnige Struktur. Von dem Vorhandensein einer aus Calciumoxalat bestehenden Kruste kann man sich bei diesen Cystolithen übrigens dadurch leicht überzeugen, dass man die Schnitte nach dem Auswaschen des Ammoniumoxalates in reine etwa 10 % Essigsäure bringt; es wird dann aus dem noch mit unverändertem Calciumcarbonat inkrustierten Kerne des Cystolithen dieses Salz allmählich unter reicher Blasenbildung gelöst, während die Calciumoxalatkruste ungelöst bleibt. Durch nachherigen Zusatz von Salzsäure wird jedoch auch diese in Lösung übergeführt, so dass dann das reine Celluloseskelett des Cystolithen übrig bleibt.

Ebenso wie die konzentrierte Lösung von oxalsaurem Ammon verhält sich übrigens auch eine wässerige 1 % Lösung von *Oxalsäure*.

§ 92. Durch *Schwefelsäure* wird das Calciumcarbonat natürlich ebenso wie das Calciumoxalat in Gyps verwandelt. Man bedient sich jedoch in diesem Falle am besten einer ziemlich stark *verdünnten* Schwefelsäure. Werden z. B. Schnitte durch das Blatt von Ficus elastica in 1 % Säure gebracht, so scheiden sich Unmassen von Gypsnadeln in der unmittelbaren Umgebung der zuvor mit Calciumcarbonat inkrustierten Cystolithen ab.

Durch *Glühen* wird das Calciumcarbonat zunächst nicht verändert, schliesslich wird es aber in Calciumoxyd verwandelt.

c) Calciumsulfat SO_4Ca.

§ 93. Calciumsulfat wurde von A. Fischer (I) bei zahlreichen Desmidiaceen nachgewiesen und zwar findet es sich hier meist in Form von winzigen Prismen oder Täfelchen, die bald scharfbegrenzten Vakuolen eingebettet sind, wie z. B. innerhalb der Zellenden von Closterium spec. (cf. Fig. 22a) oder über den gesamten von Zellsaft erfüllten Raum der betreffenden Zellen verteilt sind (cf. Fig. 22b). Zum mikroskopischen Nachweis des Gypses bediente sich A. Fischer folgender Reaktionen: *Konzentrierte Schwefelsäure* lässt den Gyps unverändert und in der

Kälte ungelöst; *Baryumchlorid* verwandelt denselben in Baryumsulfat, das in Salzsäure und Salpetersäure unlöslich ist; *Glühen* lässt die Gypskrystalle unverändert; dieselben sind ferner unlöslich in *Essigsäure*, lösen sich aber in kalter *Kalilauge, Salz-* oder *Salpetersäure* langsam, beim Erhitzen sofort.

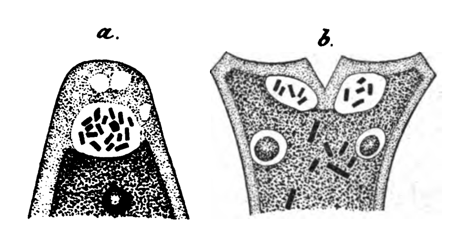


Fig. 22. a. Ein Zellende von Closterium Lunula mit Gypskrystallen im Endbläschen. b. Mittellappen von Micrasterias rotata. Die Gypskrystalle sind sämtlich ganz schwarz gezeichnet (675). Nach A. Fischer.

§ 94. Von Hansen (I, 10) wurden ferner in den Blättern verschiedener Marattiaceen sechseckige Täfelchen beobachtet, die nach den von diesem Autor ausgeführten Reaktionen aus Gyps mit einer Beimengung von Magnesiumsulfat bestehen sollen. Von Monteverde (II) wurde jedoch die Richtigkeit dieser Angaben bestritten, nach ihm bestehen die betreffenden Krystalle einfach aus Calciumoxalat. Gyps findet sich dagegen nach Monteverde reichlich im Zellsaft gelöst und soll nach monatelangem Liegen in Alkohol in Form von Sphaerokrystallen ausgeschieden werden.

Ebenso soll nach Hansen (I, 118) bei Hebeclinium macrophyllum namentlich in den jungen Holzzellen durch Alkohol eine Ausscheidung von Sphärokrystallen, die aus Gyps bestehen, bewirkt werden.

d) Calciumtartrat $\begin{matrix} \mathrm{CHOH{-}COO} \\ | \\ \mathrm{CHOH{-}COO} \end{matrix} \!\!>\! \mathrm{Ca}.$

§ 95. In vergilbten Blättern und Blattstielen von Vitis und Ampelopsis fand Schimper (II, 238) rhombische Krystalle von Calciumtartrat, die namentlich im Rinden- und Markparenchym des Blattstieles von Vitis Labrusca zum Teil eine ganz beträchtliche Grösse besitzen. Sie stellen dann namentlich häufig eine Kombination von Prisma und Doma dar, doch kommen auch die verschiedenartigsten Verwachsungen vor (cf. Fig. 23). Diese Krystalle sind in Wasser sehr wenig löslich, aber sehr leicht löslich in Kalilauge, so z. B. fast momentan in 10%, die Calciumoxalat gar nicht angreift. Charak-

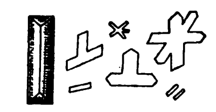


Fig. 23. Calciumtartratkrystalle aus dem Rindenparenchym eines am 22. Oktober abgeschnittenen Blattstieles von Vitis Labrusa.

teristisch ist ferner ihr Verhalten gegen Essigsäure. Die Calciumtartratkrystalle sind nämlich leicht löslich in verdünnter, etwa solcher, die 2% Eisessig enthält, während sie in reinem Eisessig und auch schon in 50% Essigsäure unlöslich sind. Infolge hiervon kann man auch beobachten, dass bei Schnitten, denen man allmählich konzentriertere Essigsäure zuströmen lässt, ein abermaliges Auskrystallisieren vorher gelöster Krystalle stattfindet.

Die Calciumtartratkrystalle sind *doppelbrechend*, doch scheint mir ihre Doppelbrechung erheblich geringer zu sein als bei den monosymmetrischen Calciumoxalatkrystallen. Beim Glühen werden sie in kugelige Massen verwandelt, die sich unter Blasenbildung in 10% Essigsäure lösen.

e) Calciumphosphat $(PO)_2(O_2Ca)_3$?

§ 96. Calciumphosphat wurde abgesehen von den Globoiden (cf. § 388) und einer noch der Bestätigung bedürftigen Angabe (cf. Nobbe, Hänlein und Councler I), bisher nur in *gelöster* Form innerhalb der Zelle beobachtet. Es scheidet sich aber nach dem Eintragen vieler Pflanzenteile in absoluten Alkohol im Inneren derselben in Form sehr schön ausgebildeter *Sphaerokrystalle* ab, so z. B. im Stengel von Euphorbia caput Medusae und Stapelia picta, sowie im Wedelstiel von Angiopteris evecta. Uebrigens bilden sich diese Sphaerite meist erst nach längerer Zeit (Wochen oder Monaten).

Sie besitzen meist eine gelbliche bis bräunliche Färbung und sind in kaltem *Wasser* sehr langsam löslich; auch in heissem Wasser lösen sie sich erst in längerer Zeit, wenigstens war auch dann, wenn die Sphaerite auf dem Objektträger in Wasser zum Sieden erhitzt waren, nach mehreren Minuten die Lösung der grösseren Sphaerite noch keine vollständige.

Gegen *Ammoniak* verhalten sie sich wie gegen Wasser; in *Essigsäure* sind sie ebenfalls nur langsam löslich, aber leicht löslich in *Salpetersäure* und *Salzsäure,* und zwar natürlich ohne Gasentwicklung.

In *Schwefelsäure* lösen sie sich sofort unter Bildung von Gypsnadeln. Werden Schnitte auf dem Objektträger in einem Gemisch von 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Teil Wasser schnell erhitzt, so zeigen die gebildeten Gypsnadeln dieselbe Begrenzung, wie die vorher vorhandenen Sphaerokrystalle. Sie unterscheiden sich von diesen aber dadurch, dass sie völlig un-

durchsichtig sind und infolge dessen im durchfallenden Lichte schwarz, im auffendem weiss erscheinen. Legt man die Schnitte dagegen in eine verdünnte z. B. 1% Schwefelsäure, so scheiden sich die Gypsnadeln allmählich in der Nähe der Sphaerite aus.

Beim *Glühen* werden die Calciumphosphatsphaerite infolge der im nächsten Paragraphen zu besprechenden organischen Beimengungen zunächst geschwärzt, bei stärkerem Glühen geben sie aber eine rein weisse Asche.

Mit *Salpetersäure und molybdänsaurem Ammon*, sowie auch mit *Magnesiumsulfat* und *Chlorammonium* geben sie die Reaktionen auf Phosphorsäure (cf. § 77).

Bei der *Untersuchung im Polarisationsmikroskop* zeigen die Sphaerokrystalle von Calciumphosphat bei gekreuzten Nikols das bekannte dunkle Kreuz; durch Einschaltung eines Gypsplättchens lässt sich ferner konstatieren, dass die Orientierung der optischen Axen bei denselben die gleiche ist wie bei den Stärkekörnern und den Sphaerokrystallen des Inulins.

In *Canadabalsam* lassen sich die besprochenen Sphaeriten beliebig lange *konservieren* und auch, zum mindesten eine beträchtliche Zeit lang, in *Glyceringelatine*.

§ 97. Die verschiedenen Sphaerokrystalle stellen nun übrigens keineswegs eine auch nur annähernd chemisch reine Verbindung dar, sie enthalten vielmehr stets eine beträchtliche Menge organischer Substanz, die namentlich häufig in der Mitte derselben einen amorphen Kern bildet, zuweilen aber auch in einzelnen Schichten enthalten ist. Diesem Umstande ist es auch zuzuschreiben, dass die Calciumphosphatsphaerite verschiedene Farbstoffe wie z. B. Methylenblau und Boraxkarmin ziemlich intensiv speichern (cf. Leitgeb III). Die chemische Zusammensetzung dieser organischen Substanz konnte übrigens bisher ebensowenig ermittelt werden, wie die Molekularformel des in den beschriebenen Sphaerokrystallen enthaltenen Calciumphosphats.

f. Nachweis des Calciums in der Asche.

§ 98. Zu diesem Zwecke empfiehlt Schimper (II, 211) namentlich die *Schwefelsäure*-Reaktion, man kann dieselbe zweckmässig so ausführen, dass man die Asche direkt in verdünnter, etwa 2% Schwefelsäure löst und dann langsam eintrocknen lässt; es entstehen dann namentlich am Rande des Tropfens Gypskrystalle, die dem monosymmetrischen Krystallsystem angehören.

Charakteristisch sind unter denselben namentlich tafelförmig ausgebildete Krystalle, deren stumpfer Winkel (α Figur 24) nach Haushofer (I, 33) 127° 31′ beträgt. Sehr häufig sind ferner auch Zwillingskrystalle, deren Kanten mit einander einen Winkel von 104° oder 130° bilden (cf. Fig. 24). Ausserdem findet man aber auch die verschiedenartigsten Verwachsungen, die aber an den frei hervorstehenden Enden nicht selten eine relativ genaue Bestimmung der Kantenwinkel gestatten.

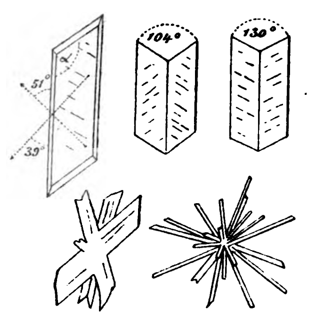


Fig. 24. Krystalle von Calciumsulfat, nach Haushofer.

Die Gypskrystalle sind ferner auch dadurch ausgezeichnet, dass sie sich auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure beim Erhitzen momentan in kleine Nadeln verwandeln, die in ihrer Gesamtheit noch die Gestalt des ursprünglichen Krystalls besitzen, aber bei einiger Dicke völlig undurchsichtig erscheinen. Diese Nadeln dürften das Anhydrit des Gypses darstellen.

Ist das Calcium schon in der Asche als Calciumsulfat enthalten, so scheidet es sich natürlich auch schon beim langsamen Verdunstenlassen der in Wasser gelösten Asche in Form der charakteristischen Krystalle ab.

g) Nachweis des Calciums im Zellsaft.

§ 99. Zum Nachweis des Calciums im Zellsaft benutzte Schimper (II, 211) namentlich folgende beiden Reaktionen.

1. Beim Zusatz von *oxalsaurem Ammon* scheidet sich Calciumoxalat in den calciumhaltigen Zellen ab und zwar bei gewöhnlicher Temperatur in Form von tetragonalen Pyramiden, in kochender Lösung dagegen in monokliner Form.

2. Frische Schnitte werden direkt in eine Lösung von *Ammoncarbonat* gebracht; bei Gegenwart von Calcium scheiden sich dann im Inneren der Zellen kleine stark doppelbrechende Rhomboëder von Calciumcarbonat ab. Bei stark saurer Reaktion des Zellsaftes ist dieser zuvor durch Ammoniak zu neutralisieren.

13. Magnesium Mg.

§. 100. Zum Nachweis des Magnesium empfiehlt Schimper (II, 214) Zusatz von einer mit etwas *Chlorammonium* versetzten

Lösung von *phosphorsaurem Natron* oder *Phosphorsalz* ($PO.OH.ONa.ONH_4$) zu den Schnitten, oder zur Asche. Es bilden sich dann rhombische Krystalle von phosphorsaurer Ammonmagnesia ($PO\,O_2\,Mg\,ONH_4$), die in Schnitten namentlich die Form von Sargdeckeln, in der Asche dagegen vorwiegend die Form von Xförmigen Skeletten besitzen (cf. Fig. 20 § 77).

Uranacetyl bewirkt bei gleichzeitiger Gegenwart von *Natrium* die Bildung der bereits erwähnten Krystalle von Magnesia-Natrium-Uranyl-Acetat (cf. § 83).

§ 101. *Magnesiumoxalat* $(COO)_2Mg$. Monteverde (I) fand in der Epidermis frischer Blätter von Setaria viridis und in getrockneten Blättern zahlreicher Paniceen radialstreifige Sphaerokrystalle oder unregelmässige Aggregate, die aus Magnesiumoxalat bestehen sollen. Dieselben waren nach den Angaben dieses Autors schwer löslich in Wasser, unlöslich in Essigsäure, löslich in Salzsäure, Salpetersäure und Schwefelsäure, in letzterer ohne Bildung von Gypsnadeln; nach Zusatz einer ammoniakalischen Lösung von Natriumphosphat und Chlorammonium bildeten sich Krystalle von phosphorsaurer Ammonmagnesia; nach dem Glühen erfolgte Lösung ohne Gasausscheidung; Gypswasser bewirkte die Bildung von Calciumoxalatkrystallen; durch Behandlung mit Kalilauge verloren die Sphaerokrystalle Streifung und Doppelbrechung und wurden löslich in Essigsäure.

Magnesiumphosphat $(PO)_2\,(O_2\,Mg)_3$ (?). Nach Hansen (I, 115) werden in Stengelstücken vom Zuckerrohr durch Alkohol Krystalle von Magnesiumphosphat niedergeschlagen, die teils die Gestalt von Drusen besitzen, teils mehr oder weniger regelmässig ausgebildete Sphaerokrystalle darstellen. Dieselben sind schwer löslich in kaltem Wasser, leichter in heissem; sie sind ferner schwer löslich in Essigsäure, aber leicht löslich in Mineralsäuren, in Schwefelsäure ohne die Bildung von Gypsnadeln. Kohlensaures Ammon gab mit denselben keinen Niederschlag, während die ammoniakalische Lösung von Salmiak und Natriumphosphat einen krystallinischen Niederschlag hervorrief. Die Phosphorsäure wurde mit molybdänsaurem Ammon nachgewiesen (cf. § 77, 1).

14. Eisen Fe.

§ 102. Von Weiss und Wiesner (I) wurde mikrochemisch nachgewiesen, dass Eisen in Form von unlöslichen Oxyd- oder Oxydulverbindungen bei den höheren Gewächsen nament-

lich die dicken Zellmembranen inkrustiert, dass es ausserdem aber auch im Inhalte der Zellen vorkommt. Die genannten Autoren benutzten als Reagenz eine weingeistige Lösung von Rhodankalium, dieselbe wurde direkt den mit einem Silber- oder Platinmesser angefertigten Schnitten zugesetzt. Trat dann sofort Rotfärbung ein, so war offenbar eine lösliche Eisenoxydverbindung vorhanden, trat sie aber erst nach Zusatz von Salzsäure ein, so wurde dadurch die Gegenwart einer in Wasser unlöslichen Eisenoxydverbindung angezeigt. In der gleichen Weise wurden Schnitte mit Rhodankalium und Chlorwasser oder Salpetersäure behandelt, um lösliche oder unlösliche Eisenoxydulverbindungen nachzuweisen.

Grössere Mengen Eisenverbindungen finden sich ausserdem als Membraninkrustationen bei verschiedenen Spaltpilzen (Cladothrix, Crenothrix u. a.) und bei Closterium, ferner bildet Eisen, wohl in Form von Oxydhydrat, dicke Krusten auf der Membran mancher Confervaceen (cf. Hanstein I). Zum mikrochemischen Nachweis des Eisens benutzt man in diesen Fällen zweckmässig eine 10% Lösung von Ferrocyankalium, der etwas Salzsäure zugesetzt ist; bei Gegenwart von Eisenoxyd bewirkt dies Reagenz natürlich sofort die Bildung von Berliner Blau. Die Gegenwart von Eisenoxydul würde sich event. in der gleichen Weise durch Ferricyankalium nachweisen lassen.

Für Leptothrix ochracea wurde durch neuere Untersuchungen von Winogradsky (II, 268) nachgewiesen, dass das Eisen zunächst in löslicher Form in den Gallerthüllen abgeschieden wird, höchst wahrscheinlich als neutrales Eisenoxydsalz einer organischen Säure. Dieses geht dann aber allmählich in ein in Wasser unlösliches basisches Salz und schliesslich in fast reines Eisenoxydhydrat über, das bei längerem Aufbewahren unter Wasser in eine in Salzsäure etwas schwerer lösliche Modifikation verwandelt wird.

B. Organische Verbindungen.

I. Fettreihe.

1. Alkohole.

Dulcit (Melampyrit) $C_6H_8(OH)_6$.

§ 103. *Dulcit* wurde von Borodin (I) in der Weise nachgewiesen, dass er auf Schnitte der zu untersuchenden Pflanzen einen oder wenige Tropfen Alkohol brachte, dieselben dann mit einem Deckglase bedeckte und langsam austrocknen liess. Das Dulcit krystallysiert dann in Form grosser prismatischer oder unregelmässiger flächenförmiger Krystalle aus, die sich von Salpeter- und Asparaginkrystallen dadurch unterscheiden, dass sie in konzentrierter Dulcitlösung unlöslich sind und sich beim Erwärmen auf 190° unter vollständiger Zersetzung in blasige dunkelbraune Massen verwandeln. Von den vielfach ähnlichen Salpeterkrystallen unterscheiden sich die Dulcitkrystalle ferner auch dadurch, dass sie sich in Diphenylamin-Schwefelsäure (cf. § 73) ohne Färbung lösen.

Geeignete Versuchsobjekte bilden z. B. einjährige Stengel von Evonymus japonicus.

2. Säuren.

a) Oxalsäure $(COOH)_2$.

§ 104. Zum Nachweis der Oxalsäure und ihrer löslichen Salze empfiehlt Schimper (II, 215):

I. Zusatz von *Calciumnitratlösung*, es bilden sich dann Krystalle von Calciumoxalat (cf. § 99, 1).

II. Zusatz von *Uranylacetat* bewirkt die Bildung rhombischer Krystalle von meist rektangulärer Gestalt, die bei hinreichender Grösse deutlich gelb und stark doppelbrechend sind, deren Zusammensetzung aber zur Zeit noch unbekannt ist.

III. *Saures oxalsaures Kali* ist, wenn es in einigermassen beträchtlicher Menge vorhanden ist, in eingetrockneten Präparaten durch Vergleich mit einer eingetrockneten Lösung dieses Salzes an der Krystallform und starken Doppelbrechung, sowie auch mit Hilfe der Borodin'schen Methode häufig direkt nachweisbar.

b) Weinsäure COOH.CHOH.CHOH.COOH.

§ 105. Von Streng (III) wurde zum Nachweis der Weinsäure der Zusatz einer Lösung von *Baryumchlorid* und *Antimonoxyd* in *Salzsäure* vorgeschlagen; dieselbe bewirkt die Bildung rhombischer Täfelchen von weinsaurem Antimonyl-Baryum, deren stumpfer Winkel 128° beträgt.

Schimper (II, 220) empfiehlt die Anwendung folgender beiden Reaktionen:

1. Zusatz von *essigsaurem Kali* bewirkt die Bildung rhombisch-hemiëdrischer Krystalle des schwer löslichen sauren Kaliumtartrats.

2. Neutrale Lösungen werden mit *Chlorcalcium* behandelt; es bilden sich dann rhombische Krystalle von Calciumtartrat, die meist eine Kombination von langgestrecktem Prisma und Doma darstellen. Ueber die Reaktionen derselben vergl. § 95.

c. Betuloresinsäure $C_{36}H_{66}O_6$.

§ 106. Die obengenannte Säure wird durch Trichomdrüsen an den Blättern von Betula alba ausgeschieden; sie ist unlöslich in Wasser, aber löslich in Alkohol, Aether, Alkalien, Alkalikarbonaten und konzentrierter Schwefelsäure, in letzterer mit roter Farbe (cf. Behrens III, 379).

3. Fette und fette Oele.

§ 107. Als Fette oder fette Oele bezeichnet man bekanntlich je nach dem Aggregatzustande die Glycerinester verschiedener organischer Säuren mit hohem Molekulargewicht, namentlich die der

Palmitinsäure $C_{15}H_{31}$ COOH,
Stearinsäure $C_{17}H_{35}$ COOH
und Oelsäure $C_{17}H_{33}$ COOH.

Ausserdem sind aber noch eine ganze Reihe zum Teil noch wenig erforschter Säuren aus den verschiedenen Oelen pflanzlichen Ursprungs isoliert worden (cf. Beilstein I, 427). Eine exakte mikrochemische Unterscheidung dieser Verbindungen ist zur Zeit noch nicht ausführbar. Selbst diejenigen Reaktionen, welche die Zugehörigkeit fraglicher Körper zu der ganzen Gruppe der Fette nachweisen sollen, lassen noch vielfach an Exaktheit

zu wünschen übrig, da sie fast sämtlich auch bei anderen Stoffen in der gleichen Weise eintreten.

§ 108. Im allgemeinen zeigen jedoch die fetten Oele die folgenden Reaktionen:

Sie sind unlöslich in kaltem und heissem *Wasser*, sie sind wenig löslich im *Alkohol*, eine Ausnahme von dieser Regel bildet aber z. B. das Ricinusöl, das in Alkohol ziemlich leicht löslich ist.

Leicht löslich sind die fetten Oele in *Schwefelkohlenstoff, Aether, Chloroform, Petroläther, Phenol, ätherischen Oelen* (wie z. B. Nelkenöl), *Aceton* und *Holzgeist*.

In *Eisessig* sind nach A. Meyer (II) die meisten fetten Oele unlöslich, wenn die Säuremenge nicht zu gross ist, wie z. B. bei Vornahme der Reaktion unter Deckglas.

Aehnlich wie Eisessig wirkt nach A. Meyer (II) auch wässerige *Chloralhydrat*lösung.

§ 109. *Alkannin*, der in den Wurzeln von Alcanna tinctoria enthaltene Farbstoff, färbt die Fette intensiv rot. Die zu dieser Färbung dienende Lösung bereitet man sich zweckmässig in der Weise, dass man das käufliche Alkannin in absolutem Alkohol löst, dann das gleiche Volumen Wasser zusetzt und filtriert. In dieser Lösung lässt man die zu prüfenden Schnitte mindestens 1—2 Stunden, besser 6—24 Stunden. Alle Oeltropfen erscheinen dann intensiv gefärbt, die gleiche Reaktion zeigen allerdings auch die ätherischen Oele und Harze. Durch Erwärmen lässt sich übrigens die Speicherung des Alkannins bedeutend beschleunigen. Dasselbe ist namentlich dann anzuempfehlen, wenn es sich um bei gewöhnlicher Temperatur feste Fette handelt, wie z. B. bei der Cacaobohne. Werden Querschnitte durch diese auf dem Objektträger in einer etwas reichlichen Menge der obengenannten Lösung bis zum Sieden derselben erhitzt, so färben sich die zu Tropfen zusammengeschmolzenen Krystalle der Cacaobutter sofort intensiv rot.

§ 110. Von Ranvier (I, 97) wurde zum Nachweis der Fette *Cyanin* (identisch mit *Chinolinblau*, *Bleu de quinoléine*) benutzt. Dieser Farbstoff ist in Alkohol ziemlich leicht löslich, aber in Wasser — namentlich kaltem — so gut wie unlöslich. Beim Verdünnen alkoholischer Lösungen mit Wasser bilden sich deshalb leicht Niederschläge, und ich fand es am zweckmässigsten, den Farbstoff in 50% Alkohol zu lösen und diese Lösung direkt zur Färbung zu verwenden. Man kann hierzu sowohl frisches Ma-

terial, als auch solches, das in irgend einer wässerigen Fixierungsflüssigkeit (z. B. wässeriger Sublimat- oder Pikrinsäurelösung) fixiert war, anwenden. Zur Färbung genügt es meist, die betreffenden Objekte etwa 1/2 Stunde in obiger Farblösung zu belassen. Ueberfärbte Schnitte können mit Glycerin oder konzentrierter Kalilauge ausgewaschen werden. Eine dauernde Konservierung derartiger Präparate in Glyceringelatine scheint nicht möglich, wenigstens war bei einem solchen Präparate schon nach einigen Monaten eine gänzliche Entfärbung eingetreten.

Als geeignete Versuchsobjekte kann ich z. B. alte Blätter von Agave americana empfehlen, die in den Leukoplasten der Epidermiszellen, wie schon von A. Meyer (II) beobachtet wurde, grosse Oeltropfen enthalten (cf. § 364). Dieselben waren an Präparaten, die in der oben beschriebenen Weise behandelt waren, intensiv gefärbt, während die Kerne und Chromatophoren ganz farblos waren. Ein Uebelstand dieser Methode besteht nur darin, dass durch dieselbe ausser den Fetten auch die verholzten und verkorkten Membranen ziemlich intensiv gefärbt werden.

§ 111. Durch *Osmiumsäure*, die gewöhnlich in 1% Lösung angewandt wird, werden die meisten Fette intensiv braun oder ganz schwarz gefärbt. Durch Wasserstoffsuperoxyd kann aber diese auf einer Reduktion beruhende Reaktion stets in kurzer Zeit wieder aufgehoben werden. Dasselbe kann nach Flemming (II) auch durch Terpentinöl, Xylol, Aether oder Kreosot geschehen, doch bedarf es dann meist mehrerer Stunden und einer gelinden Temperaturerhöhung zur völligen Entfärbung.

Durch Untersuchungen von Altmann (I, 106) wurde gezeigt, dass diese Reaktion keineswegs allen Fetten zukommt. Sie unterblieb vielmehr bei *Palmitinsäure, Stearinsäure* und den *Triglyceriden* derselben, bei dem *Mono-* und *Triglycerid des Butyrins*, bei *Lecithin, Jecorin* und *Seife*. Eine starke Schwärzung trat dagegen ein bei der freien *Oelsäure* und dem *Oleïn*. Diese beiden Verbindungen unterscheiden sich aber dadurch von einander, dass die Oelsäure auch dann noch durch Alkohol gelöst wird, wenn sie durch Osmiumsäure geschwärzt ist, das Oleïn aber nicht.

Sind in den auf fette Oele zu prüfenden Zellen gleichzeitig Gerbstoffe vorhanden, die sich mit Osmium ebenfalls schwärzen, so ist es zweckmässig diese vor dem Zusatz der Osmiumsäure durch Auskochen mit Wasser zu extrahieren. Aetherische Oele können durch Erhitzen auf 130° entfernt werden (vergl. § 145).

§ 112. Von Molisch (I, 10 Anmerk.) wurde zuerst die *Verseifung* der Fette unter dem Mikroskop ausgeführt. Er bringt zu diesem Zwecke die zu untersuchenden Schnitte in einen Tropfen eines Gemisches von gleichen Teilen konzentrierter Kalihydratlösung und konzentrierter Ammoniaklösung. Nach $^1/_2$—1 Stunde oder erst nach längerer Zeit sollen dann die Oeltropfen »ihr starkes Lichtbrechungsvermögen immer mehr einbüssend, zu myelin- oder traubenartigen Körpern oder zu unregelmässigen, oft ganz und gar aus kleineren Krystallnadeln bestehenden Massen (Seifen) erstarren.«

Uebrigens scheinen sich in dieser Beziehung verschiedene Objekte sehr verschieden zu verhalten. So erhielt ich z. B. sehr zarte Krystallnadeln (cf. Figur 25), als ich Schnitte vom Endosperm der Kaffebohne in das obengenannte Alkaligemisch brachte. Dieselben schossen nach einigen Stunden in der Umgebung sämtlicher Oeltropfen an, nach 24 Stunden waren diese stets vollständig in Krystalle verwandelt. Stellenweise beobachtete ich zwar auch dann noch inmitten der Krystallaggregate einen stark lichtbrechenden rundlichen Körper, derselbe stellte aber, wie die Beobachtung im polarisierten Lichte zeigte, einen Sphaerokrystall dar, der bei gekreuzten Nikols das bekannte dunkele Kreuz zeigte.

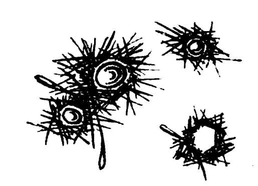


Fig 25. Oeltropfen aus dem Endosperm der Kaffebohne, 5 Stunden nach der Verseifung mit Kalilauge und Ammoniak.

Bei verschiedenen anderen Objekten, wie z. B. bei den in gleicher Weise behandelten Schnitten vom Endosperm von Bertholletia excelsa oder von den Cotylen von Helianthus annuus erhielt ich viel grössere Sphaerokrystalle oder Gruppen von solchen, die bei gewöhnlichem Lichte von Oeltropfen häufig nicht zu unterscheiden waren, sich aber im polarisierten Lichte vollständig wie Sphaerite verhielten.

Ob diese Verschiedenheiten vielleicht auf chemische Differenzen zwischen den verschiedenen Fetten zurückzuführen sind und ob überhaupt alle fetten Oele bei der beschriebenen Behandlungsweise krystallinische Bildungen geben, muss noch durch weitere Untersuchungen festgestellt werden. Ebenso ist noch zu prüfen, ob nicht andere Verbindungen, namentlich manche ätherische Oele, das gleiche Verhalten zeigen.

4. Wachs.

§ 113. Als Wachs bezeichnet man gewöhnlich die Substanz, die bei zahlreichen Gewächsen alle oberirdischen Teile überzieht und ihnen einen eigenartigen hell-blaugrünen Schimmer verleiht.

In morphologischer Hinsicht lassen sich drei verschiedene Arten von solchen Wachsüberzügen unterscheiden: Bei der ersten bildet das Wachs eine vollständig zusammenhängende Kruste über der Epidermis, bei der zweiten tritt dasselbe in Form von rundlichen Körnchen, bei der dritten in Gestalt von Stäbchen auf.

In chemischer Beziehung ist zu bemerken, dass in diesen Wachsüberzügen nach den Untersuchungen von Wiesner (I u. II) echte Fette, freie Fettsäuren und eine Anzahl anderer Substanzen enthalten sein sollen. Im wesentlichen handelt es sich hier jedenfalls um ihrer chemischen Konstitution nach noch wenig erforschte Verbindungen.

§ 114. Mikrochemisch sind die Wachsüberzüge, wie de Bary (I, 132) zuerst gezeigt hat, dadurch charakterisiert, dass sie in *Wasser* stets unlöslich sind, in siedendem Wasser aber zu Tropfen zusammenschmelzen, da ihr Schmelzpunkt stets unter 100° C liegt. Sie sind ferner unlöslich oder nur sehr schwer löslich in kaltem *Alkohol*, werden aber von siedendem Alkohol stets vollständig aufgelöst. In *Aether* sind sie zum Teil leicht löslich, zum Teil schwer löslich oder unlöslich. Beim Erhitzen in einer Lösung von *Alkannin* in 50% Alkohol fliessen die Wachsüberzüge zu roten Tropfen zusammen.

Da das Wachs von Wasser nicht benetzt wird, geschieht die Beobachtung der verschiedenen Wachsstäbchen, Körnchen etc. zweckmässiger in kaltem Alkohol, der das Wachs sofort benetzt und zunächst jedenfalls nicht löst.

§ 115. Die namentlich bei verschiedenen Epidermiszellen, wie z. B. denen von Aloë verrucosa, beobachteten *Wachsinkrustationen* der verkorkten Membranen werden nach de Bary (I) sofort sichtbar, wenn die betreffenden Schnitte unter Deckglas bis nahe an den Siedepunkt des Wassers erwärmt werden. Sie sollen dann in Tropfenform aus den Membranen austreten. Diese Tropfen sind löslich in siedendem Alkohol und verhalten sich überhaupt in chemischer Hinsicht, wie die besprochenen Wachsüberzüge. Uebrigens soll sich das Wachs aus den inkrustierten Membranen auch durch siedenden Alkohol extrahieren lassen; die Membranen

erleiden dabei stets eine entsprechende Volumverminderung, die auch durch nachheriges Eintragen in Wasser nicht wieder ausgeglichen werden kann.

5. Kohlenhydrate.

§ 116. Die Kohlenhydrate sind bekanntlich dadurch charakterisiert, dass sie ausser Kohlenstoff die Elemente Wasserstoff und Sauerstoff in dem gleichen Verhältnis, wie das Wasser, enthalten, so dass also die allgemeine Formel derselben CxH_2yOy lautet.

Uebrigens werden natürlich keineswegs alle organischen Verbindungen, welche diese empirische Zusammensetzung zeigen, zu den Kohlehydraten gerechnet, und es sind auch bereits verschiedene Substanzen, die man früher zu diesen stellte, nachdem ihre Konstitution genauer erkannt war, an anderen Stellen des natürlichen Systems der organischen Verbindungen eingeordnet. Besonders wird aber durch die neueren Untersuchungen von Emil Fischer (I) eine rationellere Einteilung der Kohlenhydrate angebahnt.

Für die mikrochemischen Methoden haben diese Untersuchungen allerdings zur Zeit noch keine Bedeutung, da eine mikroskopische Unterscheidung der hierhergehörigen Verbindungen bislang nur in den seltensten Fällen mit einiger Sicherheit ausführbar ist. So will ich mich denn auch an dieser Stelle auf die Besprechung der mikrochemischen Nachweisungsmethoden einiger *löslicher* Kohlenhydrate beschränken. Die *festen* Kohlenhydrate, die Cellulose und ihre Derivate, sowie die Stärke und die verwandten Verbindungen sollen in der III. Abteilung dieses Buches ihre Besprechung finden (vergl. § 242—297 und § 400—415).

§ 117. Bevor wir nun aber auf die Spezialreaktionen der löslichen Kohlenhydrate näher eingehen, mögen zunächst 2 vielen Kohlehydraten gemeinsame Reaktionen an dieser Stelle besprochen werden. Dieselben wurden von Molisch (V) in die Mikrochemie eingeführt und zwar zunächst speziell zum Nachweis von Zuckerarten. Als Reagentien dienen bei denselben *α-Naphtol* und *Thymol.*

Das *α-Naphtol* wendet Molisch in der Weise an, dass er nicht zu dünne Schnitte auf dem Objektträger mit einem Tropfen einer 15—20% alkoholischen Lösung der genannten Verbindung behandelt und dann 2—3 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zusetzt, so dass die Schnitte völlig untergetaucht sind. Bei Gegen-

wart von Rohrzucker, Milchzucker, Glykose, Laevulose, Maltose und Inulin färbt sich der Schnitt schon innerhalb kurzer Zeit (etwa 2 Minuten) schön violett, während die Reaktion bei alleiniger Anwesenheit von Inosit, Mannit, Melampyrit und Quercit unterbleibt.

Wurde *Thymol* an Stelle von α-Naphtol in der gleichen Weise angewandt, so entstand eine karminrote Färbung.

Bezüglich dieser Reaktionen ist jedoch einerseits zu bemerken, dass durch die im Reagenz enthaltene konzentrierte Schwefelsäure auch aus Glykosiden, Stärke, Cellulose und verschiedenen anderen Stoffen Zucker abgespalten wird, der dann indirekt die gleiche Reaktion giebt. Bei Abwesenheit von löslichen Kohlehydraten tritt jedoch in diesem Falle die Färbung stets erst bedeutend später ein, oft erst nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde. Auch kann man nach Molisch über die Anwesenheit löslicher Kohlehydrate dadurch einen gewissen Aufschluss erlangen, dass man einen frischen und einen mit kochendem Wasser extrahierten Schnitt in der gleichen Weise behandelt. Tritt bei ersterem die Reaktion bedeutend früher ein, so ist damit erwiesen, dass dieselbe auf der Anwesenheit löslicher Substanzen beruht.

Es wurde nun aber ferner von Nickel (I, 31) darauf aufmerksam gemacht, dass ausser den bereits erwähnten Verbindungen auch eine Anzahl ganz abweichend zusammengesetzter Körper die gleichen Reaktionen giebt, so namentlich Proteïnstoffe, Kreatin und Vanillin. Es ist nach Nickel sehr wahrscheinlich, dass diese Reaktionen darauf beruhen, dass die Schwefelsäure aus den genannten Verbindungen *Furfurol* abspaltet.

a) Glykose $C_6H_{12}O_6$.

§ 118. Als Glykose bezeichnet man in der botanischen Litteratur vielfach alle diejenigen Zuckerarten, die aus alkalischen Kupferlösungen Kupferoxydul abscheiden. In den meisten Fällen haben wir es hier auch wohl unstreitig mit der von den Chemikern als *Glykose* (*Traubenzucker* oder *Dextrose*), bezeichneten Verbindung zu thun; es geben jedoch auch zahlreiche andere Stoffe, wie z. B. Laevulose, Laktose und manche Glykoside die gleiche Reaktion und es ist, wenn derartige andere Verbindungen nicht ausgeschlossen sind, bei der Deutung der Kupferreaktion grosse Vorsicht geboten.

Die Ausführung der genannten Reaktion geschieht nun nach A. Meyer (IV) am besten in der Weise, dass man zunächst

2—4 Zelllagen dicke Schnitte von dem zu untersuchenden Objekte in eine konzentrierte wässerige Kupfervitriollösung bringt, dieselben nach kurzer Zeit in destilliertem Wasser abspült und dann in eine siedende Lösung von 10 gr Seignettesalz und 10 gr Kalihydrat in 10 gr Wasser taucht. Es scheiden sich dann in den zuckerhaltigen Zellen zinnoberfarbige Körnchen von Kupferoxydul ab, deren Färbung bei der Beobachtung mit Dunkelfeldbeleuchtung am besten sichtbar ist, während dieselben im durchfallenden Lichte, namentlich bei geringem Beleuchtungskegel, oft fast völlig schwarz erscheinen. In Glycerin bleibt das Kupferoxydul auch beim Kochen zunächst unverändert, nach einigen Wochen wird dasselbe aber nach A. Fischer (V, 74) vom Glycerin ebenso wie vom Canadabalsam gelöst.

§ 119. Man kann die Reaktion übrigens auch nach der von Schimper vorgeschlagenen Methode (cf. Strasburger I, 73) direkt auf dem Objektträger ausführen, indem man die nicht allzu dünnen Schnitte nach dem Umschwenken in Wasser unter Deckglas in einem Tropfen Fehling'*scher Lösung*[1]) erwärmt, bis kleine Blasen sich zu bilden anfangen, während bei stärkerem Erhitzen in der Regel starke Veränderungen im Zellinhalt eintreten.

§ 120. Um die Glykose in den *Gefässen* nachzuweisen, legte A. Fischer (V, 74) median gespaltene beliebig lange Aststücke für 5 Minuten in konzentrierte wässerige Kupfervitriollösung, spülte dieselben dann in Wasser ab und brachte sie in eine siedende Lösung von Seignette-Salz und Natronlauge, in der er sie 2—5 Minuten kochen liess. Das Kupferoxydul ist dann in den zuvor zuckerhaltigen Zellen niedergeschlagen und das Holz sehr gut schneidbar. Auch getrocknetes Holz und in grossen Stücken eingelegtes Alkoholmaterial, an dem aber vor Ausführung der Reaktion natürlich die Schnittflächen entfernt werden müssen, soll sich zur Reaktion eignen.

---

1) Die Fehling'sche Lösung kann nach Draggendorf (I, 70) zweckmässig in der Weise bereitet werden, dass man sich drei verschiedene Lösungen darstellt, die im Liter 35 gr Kupfervitriol, resp. 173 gr Seignettesalz (weinsaures Natron - Kali $COOK.CHOH.CHOH.COONa + 4H_2O$) und 120 gr Aetznatron, enthalten und unmittelbar vor dem Gebrauch je ein Volum von diesen Lösungen und 2 Volume Wasser zusammenmischt. Dies Gemisch wird mit der Zeit verändert, während sich die einzelnen Lösungen beliebig lange aufbewahren lassen.

b. Rohrzucker, Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$.

§ 121. Rohrzucker ist in der Pflanzenwelt sehr verbreitet, geeignetes Versuchsmaterial bilden z. B. Stücke von einer Zuckerrübe. Er vermag selbst bei gelindem Kochen kein Kupferoxydul aus der Fehling'*schen Lösung* abzuscheiden; bei längerem Kochen in dieser Lösung wird der Rohrzucker aber infolge der stark alkalischen Reaktion derselben in sogenannten Invertzucker, ein Gemisch von Glykose und Laevulose verwandelt, das die Fehling'sche Lösung reduziert.

Zum mikrochemischen Nachweis des Rohrzuckers bringt man nach Sachs (I, 187) nicht allzu dünne Schnitte für kurze Zeit in eine konzentrierte wässerige Lösung von Kupfersulfat, schwenkt sie schnell in Wasser um und überträgt sie dann in eine zum Sieden erhitzte Lösung von 1 Teil Kalihydrat in 1 Teil Wasser. War Rohrzucker vorhanden, so tritt dann innerhalb der Zellen eine himmelblaue Färbung ein, die sehr allmählich in das Kali hinausdiffundiert. Uebrigens ist bei dieser Reaktion stets eine genaue mikroskopische Kontrolle geboten, da, wie Sachs angiebt, bei der gleichen Behandlung häufig auch die jugendlichen Zellmembranen intensiv blau gefärbt werden.

Ausserdem kann man sich auch der Fehling'schen Lösung zum Nachweis des Rohrzuckers bedienen, die mit demselben ebenfalls eine blaue Lösung giebt; über die Anwendungsweise derselben vergl. § 119.

c) Inulin $C_{12}H_{20}O_{10}$.

§ 122. Das Inulin ist in Wasser ziemlich leicht löslich und findet sich bei zahlreichen Pflanzen im Zellsaft gelöst. Da es aber in Alkohol und Glycerin unlöslich ist, wird es, wenn inulinhaltige Pflanzenteile längere Zeit in einer dieser Flüssigkeiten aufbewahrt werden, in diesen niedergeschlagen und zwar in Form sehr wohlausgebildeter Sphaerokrystalle, die häufig grosse Zellkomplexe völlig erfüllen. Derartige Sphaerokrystalle beobachtet man, wenn man grössere Pflanzenteile, z. B. halbierte Dahlienknollen, nachdem sie einige Wochen oder auch beliebig länger in Alkohol oder konzentriertem Glycerin gelegen haben, untersucht. Dieselben sind nach längerer (jahrelanger) Aufbewahrung in Alkohol, wie Leitgeb (I, 136) gezeigt hat, in *kältem Wasser* schwer löslich, wäh-

rend sie sich bei wenige Wochen altem Alkoholmateriale ziemlich schnell darin lösen; in *heissem Wasser* sind dagegen auch die alten Inulinsphaerite leicht löslich, so dass sie sich infolge dieser Eigenschaft von den sonst ähnlichen Calciumphosphatsphaeriten (cf. § 96) relativ leicht unterscheiden lassen. Werden z. B. Schnitte von Alkoholmaterial von Dahlienknollen, die namentlich an den Schnittflächen der Knollen neben Inulin- stets auch Calciumphosphatsphaerite enthalten, auf dem Objektträger in Wasser zum Sieden erhitzt, so lösen sich die Inulinsphaerite, vorausgesetzt, dass die Schnitte nicht allzu dick sind, fast momentan, während die Sphaerokrystalle des Calciumphosphats zunächst ganz unverändert bleiben.

Sodann sind die Inulinsphaerite leicht und ohne Rückstand löslich in konzentrierter *Schwefelsäure*, während die Sphaerokrystalle von Calciumphosphat durch dieselbe in Gyps verwandelt werden (cf. § 96).

Die Fehling'sche Lösung wird durch das Inulin direkt nicht reduziert.

§ 123. Zum schnellen Erkennen des Inulins können auch die von Molisch (V, 918) empfohlenen Zuckerreagentien dienen (§ 117). So lösen sich z. B. die Sphaerokrystalle des Inulins unter sehr intensiver Violettfärbung, wenn man sphaeritenhaltige Schnitte mit einer 10% alkoholischen α-*Naphthol*-Lösung betupft, dann einige Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zusetzt und nach dem Bedecken mit einem Deckglase gelinde erwärmt.

Wird dagegen *Thymol* in der gleichen Weise zugesetzt, so tritt nach Molisch eine rote Färbung auf.

Von Green (I) wurde ferner *Orcin* als Reagenz auf Inulin empfohlen. Die zu untersuchenden Schnitte werden mit alkoholischer Orcinlösung getränkt und in Salzsäure gekocht. Bei Gegenwart von Inulin soll dann eine tief orangerote Färbung entstehen; etwa vorhandene Sphaerokrystalle von Inulin werden natürlich gelöst, der von ihnen eingenommene Raum erscheint dann rot.

Wenn man statt Orcin *Phloroglucin* anwendet, soll eine mehr braune Farbe auftreten.

d) Glykogen $C_6H_{10}O_5$.

§ 124. Das Glykogen, das nach den Untersuchungen von Errera in den Pilzzellen sehr verbreitet ist, ist nach den Untersuchungen des genannten Forschers dadurch charakterisiert, dass

es innerhalb der lebenden Zellen eine farblose stark lichtbrechende Substanz bildet und sich mit *Jodjodkaliumlösung* intensiv rotbraun färbt. Diese Färbung verschwindet beim Erwärmen auf 50—60°, um beim Erkalten wieder zu erscheinen. Ausserdem löst sich das Glykogen in Wasser, wenn man das Präparat zerdrückt (Errera I).

Da die Intensität der durch Jod bewirkten Färbung je nach der Menge des vorhandenen Glykogens grösser oder geringer ausfällt, lässt sich bei Anwendung gleich konzentrierter Jodlösungen aus der Farbe ein Schluss ziehen auf die Quantität des Glykogens. Errera (II) bringt zu diesem Zwecke die zu untersuchenden Objekte direkt in eine Lösung von 45 gr Wasser, 0,3 gr Jodkalium und 0,1 gr Jod. Ist das Glykogen in äusserst geringer Quantität vorhanden, so wird die Färbung eher orange als braun. Dann lässt sich eine etwas konzentriertere Jodlösung (1 : 100) anwenden; mit dieser ist aber sehr vorsichtig zu operieren.

c) Dextrin $C_{12}H_{20}O_{10}$.

§ 125. Als Dextrin bezeichnet man das Uebergangsprodukt aus Stärke in Maltose; es unterscheidet sich von der Letzteren dadurch, dass es schon in 84 % Alkohol unlöslich ist. Von Sachs (I, 187) wurde deshalb zum mikrochemischen Nachweis des Dextrins vorgeschlagen, Schnitte von Pflanzenteilen, in denen mit Fehling'scher Lösung die Anwesenheit von Kupferoxyd reduzierenden Substanzen nachgewiesen war, für 10—24 Stunden in 95 % Alkohol zu tauchen, so dass die Glykose aus denselben vollständig gelöst wurde. Fand dann die Kupfer-Reaktion trotzdem noch in der gleichen Weise statt, so schloss er auf die Anwesenheit von Dextrin. Nach neueren Untersuchungen vermag nun aber das reine Dextrin die Fehling'sche Lösung nicht zu reduzieren, und es ist auch noch zweifelhaft, ob dasselbe überhaupt in nachweisbarer Menge innerhalb des pflanzlichen Organismus vorkommt (cf. Beilstein I, 883).

6. Schwefelverbindungen.

Von den Schwefelverbindungen der Fettreihe hat man bisher nur das Knoblauchöl und das Senföl mikrochemisch nachzuweisen versucht.

a) Knoblauchöl, Allylsulfid $S(CH_2.CH:CH_2)_2$.

§ 126. Das in fast allen Teilen der verschiedenen Alliumarten vorkommende Knoblauchöl giebt mit:

Platinchlorid einen charakteristisch gelben Niederschlag, mit

Quecksilbersalzen eine weissliche Fällung, mit

salpetersaurem Palladiumoxydul einen kermesbraunen Niederschlag, mit

1—2% *Silbernitratlösung* eine feinkörnige Fällung von Schwefelsilber, mit

konzentrierter Schwefelsäure eine schöne Rotfärbung, mit

Goldchlorid einen gelben Niederschlag.

Für mikrochemische Zwecke leisten nach Voigt (I) namentlich Palladiumoxydulnitrat und Silbernitrat die besten Dienste, und zwar erwies es sich als zweckmässig, grössere Pflanzenteile in die Lösungen zu legen und das Eindringen derselben durch Evakuieren zu beschleunigen. Nach vorausgegangener Härtung in Alkohol wurden dann Schnitte aus denselben angefertigt.

b) Senföle, Alkylthiocarbimide SC:N—R.

§ 127. Als Senföle bezeichnet man eine Gruppe homologer Verbindungen, die die Atomgruppe SC:N und ein Alkylradikal enthalten. Der bekannteste derselben ist das *Allylsenföl* $CSNC_3H_5$, welches durch das Ferment *Myrosin* aus dem zu den Glykosiden gehörigen *myronsauren Kalium*, das sich namentlich im Samen des schwarzen Senfs befindet, abgespalten wird. Die von Solla (II) zum mikrochemischen Nachweis des Allylsenföls vorgeschlagenen Reaktionen haben sich bei der Prüfung durch Bachmann (VI) und Molisch (I, 33) als unbrauchbar erwiesen, so dass es zur Zeit noch an mikrochemisch verwendbaren Spezialreaktionen für diese Körper fehlt.

7. Amidoverbindungen.

§ 128. Die Amidoverbindungen (Amidosäuren und Säureamide) sind bekanntlich dadurch charakterisiert, dass sie das einwertige Radikal NH_2 enthalten; sie sind somit stickstoffhaltig und spielen auch bei der Bildung und Wanderung der Eiweissstoffe höchst wahrscheinlich eine ganz hervorragende Rolle. Zuverlässige mikrochemische Nachweisungsmethoden besitzen wir zur Zeit jedoch unter den Amidoverbindungen der Fettreihe nur

für das *Leucin* und das *Asparagin,* von den aromatischen Amidoverbindungen sei ferner das *Tyrosin* bereits an dieser Stelle erwähnt (cf. § 134).

a) Leucin (Amidokapronsäure) $C_4H_9 . CHNH_2 . COOH$.

§ 129. Leucin wurde von Borodin (IV) in den Blättern verdunkelter Exemplare von Paspalum elegans und Dahlia variabilis mikrochemisch nachgewiesen. Er benutzte zu diesem Zwecke die Eigenschaft desselben bei vorsichtigem Erhitzen auf 170° ohne Zersetzung zu *sublimieren.* Es wurden auf den Objektträger ausgetrocknete Schnitte mit einem reinen Deckglase bedeckt und vorsichtig erhitzt; bei Gegenwart von Leucin werden durch diese Manipulation auf der Unterseite des Deckglases winzige krystallinische, doppelbrechende Schüppchen von dieser Verbindung niedergeschlagen, die noch mit Hilfe einer konzentrierten wässerigen Leucinlösung weiter geprüft werden können (cf. § 71, Anm.).

Uebrigens scheidet sich das Leucin, ebenso wie das Asparagin und Tyrosin in krystallinischer Form ab, wenn man die dasselbe enthaltenden Schnitte mit Alkohol betupft und unter Deckglas allmählich austrocknen lässt.

b) Asparagin (Amidobernsteinsäureamid) $COOH . C_2H_3NH_2 . CONH_2$.

§ 130. Asparagin ist in Wasser löslich und findet sich auch innerhalb der Pflanzenzellen nur in Lösung. Zum Nachweise des Asparagins wird nach der von Borodin (II) zuerst angewandten Methode den mit einem Deckglase bedeckten Schnitten absoluter Alkohol zugesetzt und dann das Präparat langsam eintrocknen gelassen. Es scheidet sich dann das Asparagin in Krystallen ab, unter denen namentlich rhombische Tafeln mit einem stumpfen Winkel von 129° 18′ sehr charakteristisch sind, während dieser Winkel bei den sonst ähnlichen Krystallen von *Kalinitrat* 99° 44′ beträgt [1]). Es ist somit bei einiger Uebung meist schon ohne Winkelmessung eine sichere Unterscheidung zwischen Asparagin und Salpeter möglich (cf. Fig. 26 u. 27). Ueb-

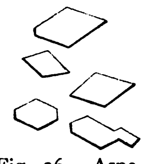


Fig. 26. Asparaginkrystalle.

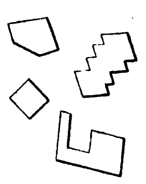


Fig. 27. Salpeterkrystalle.

1) Möglich sind allerdings auch Winkel von 109° 56′ und 118° 50′ (cf. C. O. Müller

rigens wird die Beobachtung der Krystalle durch Anwendung des *polarisierten Lichtes* sehr erleichtert.

Ausserdem kann man auch nach der bereits von C. O. Müller (I) angewandten Methode *Diphenylaminlösung* zur Unterscheidung von Salpeter und Asparagin benutzen, da durch diese Lösung das Letztere ohne Färbung gelöst wird, während dieselbe mit Salpeterkrystallen eine intensiv blaue Färbung hervorruft (cf. § 73).

Charakteristisch ist ferner das Verhalten der Asparaginkrystalle beim Erhitzen; dieselben lösen sich nämlich bei ca. 100° in ihrem Krystallwasser, während bei ca. 200° die Verwandlung in braune Schaumtropfen stattfindet.

Schliesslich können fragliche Krystalle auch nach der Borodin'schen Methode (cf. § 71 Anm.) mit einer gesättigten wässerigen Asparaginlösung auf Asparagin geprüft werden.

Nach Leitgeb (II, 222) wird nun aber durch gleichzeitige Anwesenheit von Inulin, sowie Gummi, Zucker, Glycerin und anderen viskosen Flüssigkeiten, die Krystallisation des Asparagins verhindert. Der genannte Autor konnte jedoch in den Inulin-reichen Dahlia-Knollen Asparagin dadurch nachweisen, dass er ca. 1 cm hohe Querscheiben derselben in 90 % Alkohol brachte. Nach einigen Tagen beobachtete er dann an den Schnittflächen wohl ausgebildete Krystalle, die nach möglichst vollständiger Reinigung vom Inulin die oben beschriebenen Asparagin-Reaktionen gaben.

II. Aromatische Reihe.

1. Phenole.

a. Eugenol $C_6H_3 . OH . OCH_3 . C_3H_5$.

§ 131. Zum Nachweis des im Piment- und Nelkenöl enthaltenen Eugenols empfiehlt Molisch (I, 40 u. 44) *Kalilauge*, und zwar bringt er die betreffenden Schnitte in eine *völlig gesättigte* Lösung von Kaliumhydroxyd. Es bilden sich dann nach einiger Zeit (etwa 5 Minuten) aus jedem Oeltropfen zahlreiche, oft sehr lange, säulen- oder nadelförmige farblose Krystalle von nelkensaurem Kali. Als geeignete Versuchsobjekte sind namentlich Schnitte von Gewürznelken zu empfehlen.

I, 15); ich habe diese Winkel übrigens auch beim langsamen Auskrystallisierenlassen von reinem Kalinitrat niemals auftreten sehen.



Weniger zuverlässig sind die Reaktionen mit konzentrierter *Schwefel-* oder *Salpetersäure*. Erstere färbt das Eugenol erst gelblich, dann sofort intensiv blutrot, nach einiger Zeit mit einem Stich ins Violette und schliesslich braun. Konzentrierte Salpetersäure färbt dasselbe feurig-orange- bis braunrot.

b) Phloroglucin $C_6H_3(OH)_3$.

§ 132. Phloroglucin findet sich innerhalb der lebenden Zelle wohl nur im Zellsaft gelöst. Zum mikrochemischen Nachweis desselben benutzt man am besten das von Lindt (I) vorgeschlagene Gemisch von *Vanillin* und Salzsäure, das in der Weise bereitet wird, dass 0,005 gr Vanillin in 0,5 gr Spiritus gelöst werden, dann 0,5 gr Wasser und 3,0 gr konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt werden. Dies Reagenz wird am zweckmässigsten den zuvor ausgetrockneten Schnitten zugesetzt; bei Gegenwart von Phloroglucin entsteht dann eine hellrote, später etwas violettrot werdende Färbung, während *Orcin* eine hellblaue etwas rotstichige Färbung giebt; zahlreiche andere verwandte Substanzen gaben dagegen gar keine Färbung.

Uebrigens sind nicht allzu geringe Phloroglucinmengen auch durch die bei Salzsäurezusatz eintretende *Rotfärbung der verholzten Membranen* nachweisbar (cf. § 255 u. 257).

Nach Waage (I, 253) soll das Phloroglucin innerhalb der lebenden Zellen ebenso wie die Gerbstoffe *Methylenblau* speichern.

c) Asaron $C_6H_2.(OCH_3)_3.C_3H_5$.

§ 133. Asaron findet sich namentlich im Rhizom und in der Wurzel von Asarum europaeum, und zwar ist dasselbe hier in einem höchst wahrscheinlich ätherischen Oele gelöst, das zahlreiche parenchymatische Zellen der Rinde fast ganz erfüllt. Es lässt sich mit Wasserdämpfen überdestillieren und bildet dann farblose Kryställchen, die in Wasser unlöslich sind, aber leicht löslich in Alkohol, Aether, Chloroform und Essigsäure.

Zum mikrochemischen Nachweise des Asarons empfiehlt Borscow (I, 18) namentlich konzentrierte *Schwefelsäure*, die dasselbe zunächst gelb, später orange färbt. Die gleiche Reaktion zeigen auch die in den frischen Schnitten enthaltenen Asaron-haltigen Oeltropfen.

2. Säuren.

a) Tyrosin (p-Oxyphenyl-α-Amidopropionsäure) $C_6H_4OH . CH_2 . CHNH_2 . COOH$.

§ 134. Tyrosin wurde namentlich von Borodin (II, 816 u. III, 591) in verschiedenen Pflanzenteilen mikrochemisch nachgewiesen. Er verfuhr zu diesem Zwecke in der Weise, dass er Schnitte von den zu prüfenden Objekten mit Alkohol betupfte und dann allmählich austrocknen liess. Das Tyrosin krystallisiert dann in dendriten- oder büschelartig gruppierten Nadeln aus, die stark doppelbrechend sind.

Dieselben sind in Wasser ziemlich schwer löslich (bei 20° in 2454 Teilen, bei 100° in 154 Teilen, nach Beilstein II, 1006); sie sind natürlich unlöslich in konzentrierter wässeriger Tyrosinlösung, doch dürfte die Borodin'sche Methode (§ 71, Anm.), wegen der schweren Löslichkeit des Tyrosins in diesem Falle wohl nur schwierig mit Exaktheit anzuwenden sein. Charakteristisch ist jedoch für die Tyrosinkrystalle, dass sie durch Millon's Reagens intensiv rot gefärbt werden; ferner hinterlassen dieselben einen gelbgefärbten Rückstand, wenn sie vorsichtig mit *Salpetersäure* verdampft werden; aus diesem entsteht bei Zusatz von Natronlauge eine tief rotgelbe Flüssigkeit, nach deren Verdunstung krystallinische rotbraun gefärbte Ausscheidungen sichtbar werden (Leitgeb II, 229).

§ 135. Nach Leitgeb (II) wird die Krystallisation des Tyrosins durch gleichzeitig anwesendes Inulin je nach der Menge desselben mehr oder weniger vollständig verhindert. Es gelang jedoch dem genannten Autor auch aus den Knollen von Dahlia grosse Krystallaggregate von Tyrosin zu erhalten, und zwar in der Weise, dass er eine durch einen Querschnitt halbierte Knolle mit der Schnittfläche nach oben in ein cylindrisches Gefäss brachte und dasselbe dann soweit mit Alkohol füllte, dass wenigstens $^1/_8$ des Objektes aus demselben herausragte. Das Tyrosin krystallisierte dann meist schon nach wenigen Tagen an der Querschnittsfläche der Knollen aus.

b) Ellagsäure $C_{14}H_6O_8 + 2\ H_2O$.

§ 136. Innerhalb des Stammes und der Wurzel der an der »malattia dell' inchiostro« erkrankten Kastanienbäume fand G. Gi-

belli (I) Sphaerokrystalle von Ellagsäure. Dieselben waren in *Wasser* und *Alkalien* löslich, im *kohlensaurem Kali* lösten sie sich mit gelber, in konzentrierter *Salpetersäure* mit granatroter Farbe. *Eisenchlorid* erzeugte eine grün-schwarze, *salpetersaures Silber* eine rotbraune Färbung.

3. Aldehyde.

Vanillin $C_6H_3.OH.OCH_3.CHO$.

§ 137. Das Vanillin findet sich auf der Oberfläche getrockneter Vanilleschoten häufig in krystallinischer Form; im Inneren derselben wird es dagegen nur im gelösten oder amorphen Zustande angetroffen. Es ist leicht löslich in Aether und Alkohol, schwer löslich in kaltem Wasser, leichter in heissem. Durch *Eisenchlorid* wird es blau gefärbt, doch ist diese Reaktion nach Molisch (I, 47) mikrochemisch nicht zu verwenden. Ausserdem giebt das Vanillin auch mit zahlreichen organischen Verbindungen charakteristische Farbenreaktionen: so färbt es sich ziegelrot mit *Phloroglucin* oder *Resorcin* und Schwefelsäure, rotviolett mit *Phloroglucin* und Salzsäure, gelb mit *Anilinsulfat*, rot mit *Orcin* und Salzsäure, gelb mit *Metadiamidobenzol*, karminrot mit *Thymol*, Salzsäure und Kaliumchlorat (cf. § 254).

Von diesen Reagentien eignen sich nach Molisch zum mikrochemischen Nachweis des Vanillins am besten *Orcin* und *Phloroglucin*. Das erstere wird zweckmässig in 4 % Lösung angewandt und mit dieser die zu prüfenden Schnitte auf dem Objektträger benetzt und dann ein grosser Tropfen konzentrierter Schwefelsäure hinzugefügt. War Vanillin vorhanden, so färbt sich der Schnitt momentan in seiner ganzen Ausdehnung intensiv karminrot. Verwendet man in der gleichen Weise *Phloroglucin*, so erhält man mit Schwefelsäure momentan eine ziegelrote Färbung, doch soll die durch Orcin bewirkte Färbung noch auffallender sein.

4. Chinone.

§ 138. Die Chinone sind dadurch ausgezeichnet, dass bei ihnen zwei im Benzolkern in der Parastellung befindliche Wasserstoffatome durch zwei Sauerstoffatome ersetzt sind, die mit ihrer zweiten Valenz entweder unter einander oder mit beiden Valenzen an die betreffenden Kohlenstoffatome gebunden sind. Sie sind meist intensiv gelb gefärbt. Dass sie im Chemismus der Pflanze eine

hervorragende Rolle spielen sollten, ist nach den vorliegenden Untersuchungen nicht gerade sehr wahrscheinlich. Mikrochemisch nachgewiesen wurde bisher das *Nucin*, das *Emodin* und die *Chrysophansäure*.

a) Juglon, Nucin, Oxynaphtochinon $C_{10}H_6O_2 . OH$.

§ 139. Nucin wurde von O. Herrmann (I, 183) im Zellsaft der Parenchymzellen der äusseren Fruchtschale von Juglans regia mikrochemisch nachgewiesen. Er benutzte zu diesem Zwecke *Ammoniaklösung* oder noch besser *Ammoniakdämpfe*, die das Nucin zunächst prachtvoll purpurn färben; allmählich geht diese Färbung aber in braun über.

b) Emodin, Trioxymethylanthrachinon $C_{14}H_4O_2 . CH_3 . (OH)_3$.

§ 140. Bei der Flechte Nephoroma lusitanica beobachtete Bachmann (I), dass den Hyphen des Markes kleine gelbe Krystallkörnchen äusserlich anhaften, die nach ihren mikrochemischen Reaktionen mit dem bisher makrochemisch nur aus der Rhabarberwurzel und den Früchten von Rhamnus frangula dargestellten Emodin übereinstimmen. Sie werden zunächst, wie die *Chrysophansäure* (cf. § 141) von *Kali-* und *Natronlauge* mit roter Farbe gelöst, *Kalk* und *Barytwasser* färben sie dunkelrot, lösen sie aber nicht. Sie unterscheiden sich aber von der Chrysophansäure dadurch, dass sie in *Alkohol, Eisessig* und *Amylalkohol* leicht löslich sind und von konzentrierter *Schwefelsäure* mit safrangelber Farbe gelöst werden, während die Chrysophansäure in den ersten drei Reagentien nur sehr schwer löslich ist und sich in Schwefelsäure mit schön rosenroter Farbe löst. Nach Fr. Schwarz (II, 251) unterscheidet sich das Emodin ferner dadurch von der Chrysophansäure, dass es in *Ammonkarbonat* mit roter Farbe löslich ist, während die Chrysophansäure in diesem Reagens unverändert bleibt.

c) Chrysophansäure $C_{14}H_5O_2 . CH_3 . (OH)_2$.

§ 141. Chrysophansäure wurde namentlich in der Flechte Physcia parietina und in den Wurzeln verschiedener Polygonaceen beobachtet. In den letzteren findet sie sich nach Borscow (I) in Form gelbgefärbter Körnchen, die dem Cytoplasma eingebettet sein sollen. Bei Physcia ist sie dagegen, wie Fr. Schwarz

(II, 262) im Gegensatz zu Borscow (I) nachgewiesen hat, in Form krystallinischer Körnchen der Membran aufgelagert. Dieselben sind übrigens sehr klein und nur bei starker Vergrösserung deutlich zu erkennen. Im polarisierten Lichte leuchten sie bei gekreuzten Nikols hell auf. Charakteristisch für dieselben ist die intensiv karmoisinrote Färbung, die sie mit *Kalilauge* oder *Ammoniak* annehmen, *Kalk-* und *Barytwasser* färben dieselbe dunkelrot, aber ohne sie zu lösen (cf. ferner § 140).

5. Kohlenwasserstoffe $(C_{10}H_{16})x$.

§ 142. Unter obiger Bezeichnung wird von Beilstein (III, 279) eine grosse Gruppe verschiedenartiger Pflanzenstoffe zusammengefasst, die entweder direkt *Terpene* von der Zusammensetzung $C_{10}H_{16}$ oder Polymerisationsprodukte derselben darstellen oder wenigstens zu diesen in naher Beziehung stehen. Es gehören hierher ausser den eigentlichen *Terpenen* namentlich die *ätherischen Oele, Kautschuk* und *Guttapercha,* die *Harze* und *Balsame.* Uebrigens ist die chemische Konstitution der hierher gerechneten Verbindungen zum Teil noch sehr wenig erforscht, und es werden wohl sicher mit der Zeit noch viele der hierher gestellten Substanzen, namentlich viele sogenannte ätherische Oele an verschiedenen Stellen des natürlichen Systems der organischen Verbindungen untergebracht werden. So besteht z. B. der Hauptbestandteil des sogenannten ätherischen Oeles der Allium spez., das Knoblauchöl, aus einer relativ einfachen Verbindung, dem Allylsulfid (cf. § 126).

Da nun für die meisten der hierher gehörigen Verbindungen mikrochemisch anwendbare Spezialreaktionen fehlen, wird man sich zur Zeit, wenn nicht makroskopische Untersuchungen über die in der betreffenden Pflanze vorkommenden Stoffe mikrochemisch verwertbare Anhaltspunkte liefern, in den meisten Fällen damit begnügen müssen, die Zugehörigkeit zu der Gesamtgruppe, die man wohl zweckmässig als die Gruppe der *terpenartigen Verbindungen* bezeichnen kann, nachgewiesen zu haben. In vielen Fällen wird sogar dieser Nachweis bei dem Mangel völlig zuverlässiger Gruppenreaktionen nicht einmal mit Sicherheit ausführbar sein.

§ 143. Wenn wir nun zunächst von dem Kautschuk und Guttapercha absehen, so sind die meisten der hierhergehörigen Verbindungen durch *starke Lichtbrechung* und dadurch, dass sie

in *Wasser völlig oder nahezu unlöslich* sind, ausgezeichnet. Sie sind dagegen löslich in den Lösungsmitteln der Fette, wie *Aether, Chloroform, Schwefelkohlenstoff, Benzol* und *ätherischen Oelen.* Auch in *Alkohol* sind sie meist schon in der Kälte leicht löslich. Durch *Alkannin* werden sie ebenso wie die Fette intensiv gefärbt und zwar verfährt man zu diesem Zwecke genau so wie bei den fetten Oelen (§ 109).

Ausserdem seien noch folgende Spezialreaktionen erwähnt:

a) Aetherische Oele.

§ 144. Zum speziellen Nachweis der *ätherischen Oele,* die makrochemisch dadurch charakterisiert sind, dass sie aus den betreffenden Pflanzenteilen durch Destillation mit Wasserdämpfen gewonnen werden können und auf Papier einen nach einiger Zeit wieder verschwindenden Fettfleck hinterlassen (Beilstein III, 303) kann man mikrochemisch namentlich die *Flüchtigkeit* derselben verwenden. Um auf diese zu prüfen, verfährt man zweckmässig in der Weise, dass man Schnitte von den betreffenden Pflanzenteilen einige Zeit in Wasser kocht und vor und nach dieser Procedur mikroskopisch untersucht.

Nach A. Meyer (II) genügt es auch zur Vertreibung aller ätherischen Oele die nicht mit einem Deckglase bedeckten Schnitte 10 Minuten lang im Wärmeschrank auf 130° zu erhitzen, während die *fetten* Oele bei dieser Behandlungsweise unverändert bleiben.

Im übrigen stimmen die ätherischen Oele auch insofern mit den fetten Oelen überein, als sie durch *Osmiumsäure* gebräunt oder geschwärzt und durch *Alkannin* und *Cyanin* intensiv gefärbt werden (cf. § 109—111).

Die meisten ätherischen Oele sind ferner leicht löslich in *Eisessig* und wässeriger *Chloralhydratlösung.*

Erwähnt mag an dieser Stelle noch werden, dass J. Behrens (I) an den Drüsenhaaren von Ononis spinosa die Ausscheidung einer stark lichtbrechenden Verbindung beobachtet hat, die dadurch ausgezeichnet war, dass sie sich selbst in sehr verdünnten wässerigen *Fuchsinlösungen* intensiv rot färbte. Ueber die chemische Zusammensetzung dieses Sekretes lässt sich nichts Bestimmtes aussagen, doch ist wohl wahrscheinlich, dass es in die Kategorie der ätherischen Oele gehört.

b) Harze und Terpene.

§ 145. Als Spezialreagenz auf *Harze* und *Terpene* kann die sogenannte Unverdorben-Franchimont'sche Reaktion mit *Kupferacetat* benutzt werden. Nach dieser werden grössere Stücke von den zu untersuchenden Pflanzenteilen in eine konzentrierte wässerige Lösung des genannten Salzes gebracht und frühestens nach ca. 6 Tagen untersucht. Die Harze erscheinen dann schön smaragdgrün gefärbt. Vor dem Schneiden kann man übrigens das Kupferacetat zweckmässig durch Auswaschen mit fliessendem Wasser entfernen. Die so behandelten Stücke lassen sich in 50% Alkohol konservieren. Auch die mikroskopischen Präparate behalten beim Einschluss in Glyceringelatine ihre schöne Färbung.

Ausserdem wurde auch Alkannin (cf. § 109) bei der Untersuchung der Harze vielfach angewandt. Die mit diesem Farbstoff behandelten Präparate scheinen sich jedoch nach einigen diesbezüglichen Versuchen des Verf. in Glyceringelatine nicht konservieren zu lassen.

Im Anschluss an die Harze seien ferner noch folgende makrochemisch bisher nur sehr unvollkommen untersuchte Verbindungen besprochen.

α) Pilz-Gutti.

§ 146. Als Pilz-Gutti bezeichnet Zopf (V, 53) einen gelbgefärbten harzartigen Stoff, der in allen bisher geprüften Eigenschaften mit dem den Hauptbestandteil des Gummigutts bildenden *Gummiguttgelb* übereinstimmt. Derselbe findet sich im Fruchtkörper von Polyporus hispidus namentlich in den Membranen abgelagert, ausserdem aber auch als Exkret ausserhalb der Membranen und auch im Zellinhalt. Zum mikrochemischen Nachweise des Pilz-Guttis benutzt Zopf namentlich *Eisenchloridlösung*, die das Pilz-Gutti, resp. die mit demselben durchtränkten Membranen olivengrün bis schwarzbraun färbt. Ausserdem ist das Pilz-Gutti unlöslich in *Wasser*, aber leicht löslich in *Alkohol* und *Aether*; von konzentrierter *Salpeter-* oder *Schwefelsäure* wird es mit roter Farbe gelöst, bei Wasserzusatz aber wieder in gelben Flöckchen ausgefällt.

β) Harzsäure aus Telephora spec.

§ 147. Von Zopf (V, 77) wurde aus verschiedenen Telephora spec. eine Harzsäure dargestellt, die teils im Zellinhalt vor-

kommt, teils den Membranen ein- oder aufgelagert ist. Dieselbe ist unlöslich in kaltem oder heissem *Wasser*, löslich in *Alkohol, Aether, Methylalkohol, Petroleumäther, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff* und *Terpentin*; durch konzentrierte *Schwefelsäure* wird sie mit blaurother Farbe gelöst, durch Zusatz von viel Wasser in grünlichgelber Farbe wieder abgeschieden.

γ) Harzsäure aus Trametes cinnabarina.

§ 148. Die von Zopf (V, 88) aus dem obengenannten Pilze dargestellte Harzsäure stimmt mit der vorstehenden in ihren Löslichkeitsverhältnissen völlig überein; sie unterscheidet sich aber von derselben dadurch, dass sie durch konzentrierte *Schwefelsäure* mit gelbbrauner bis rotbrauner Farbe gelöst wird. Mit *Eisenchlorid* nimmt sie im Gegensatz zu dem Pilz-Gutti keine olivenbraune Färbung an.

δ) Harzsäure aus Lenzites saepiaria.

§ 149. Nach Bachmann (II, 7) sitzen den Membranen von Lenzites saepiaria an vielen Stellen undurchsichtige Kügelchen oder Körnchen einer Harzsäure auf. Dieselben sollen von alkoholischer oder wässeriger *Kali-* oder *Natronlauge* sehr schnell mit dunkel olivengrüner Farbe gelöst werden.

6. Glykoside.

§ 150. Als Glykoside bezeichnet man eine Gruppe von im Pflanzenreich sehr verbreiteten esterartigen Verbindungen, die dadurch charakterisiert sind, dass sie durch verschiedene Mittel, namentlich Säuren, Alkalien oder Fermente, in eine Zuckerart und eine oder mehrere andere Verbindungen gespalten werden. In den meisten Fällen ist diese Zuckerart Glykose. Uebrigens rechnet man zu den Glykosiden häufig auch solche Verbindungen, bei deren Spaltung kein echter Zucker entsteht, wie z. B. das Phloretin, bei dem sich Phloroglucin an Stelle von Glykose bildet (cf. Beilstein III, 322).

Die bei der Spaltung Glykose liefernden Glykoside können unter Umständen mit Hilfe der Fehling'schen Lösung (cf. § 119) mikrochemisch nachgewiesen werden, falls sie direkt die Kupferlösung nicht reduzieren, wohl aber nachdem — etwa durch Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure — aus ihnen die Glykose

frei gemacht ist. Uebrigens giebt es auch zahlreiche Glykoside, die die Fehling'sche Lösung direkt reduzieren.

Auch in ihrem übrigen Verhalten zeigen die Glykoside grosse Verschiedenheiten und es fehlt zur Zeit noch gänzlich an Reaktionen, die der ganzen Gruppe der Glykoside gemeinsam wären. Wir müssen uns daher an dieser Stelle auf die spezielle Besprechung einiger Glykoside beschränken, für die bereits mikrochemisch anwendbare Spezialreaktionen angegeben wurden.

a) Coniferin $C_6H_3 . OCH_3 . C_3H_4OH . OCH_2(COH)_4 CHO$.

§ 151. Coniferin wurde bisher makrochemisch namentlich aus dem Cambialsafte verschiedener Coniferen dargestellt. Es ist jedoch, obwohl das Coniferin eine beträchtliche Anzahl von Farbenreaktionen zeigt, bisher nicht gelungen, dasselbe innerhalb der Zellen mikrochemisch nachzuweisen. Dahingegen gelingen die verschiedenen Coniferinreaktionen sehr leicht bei allen verholzten Zellmembranen und es wird meist angenommen, dass dieselben Coniferin enthalten (cf. § 254—256).

b) Datiscin $C_{21}H_{22}O_{12}$.

§ 152. Datiscin wurde von O. Herrmann (I, 9) namentlich im Zellsaft des Rindenparenchyms und als Membran-Einlagerung in den dickwandigen Zellen der Rinde und des Holzes von Datisca cannabina mikrochemisch nachgewiesen. Der genannte Autor benutzte zu diesem Zwecke namentlich *Kalk-* und *Barytwasser*, die mit Datiscin eine reingelbe Lösung geben und eine intensive gelbe Färbung aller Datiscin-haltigen Zellen bewirken, während ein nachheriger Zusatz von Essigsäure oder verdünnter Salzsäure die Färbung augenblicklich wieder zum Verschwinden bringt. Ausserdem gibt das Datiscin mit *essigsaurem Blei* oder *Zinkchlorür* gelbe Niederschläge, mit *Kupferoxydsalzen* grünliche, mit *Eisenchlorid* dunkel braungrüne Fällungen.

c) Frangulin $C_{20}H_{20}O_{10}$.

§ 153. Das Frangulin bildet eine gelbgefärbte krystallinische Masse, die in *Wasser* unlöslich ist, sich aber in *Alkalien* mit kirschroter Farbe löst. Innerhalb der parenchymatischen Elemente der Stengel von Rhamnus frangula soll dasselbe nach Borscow (I, 33) an kleine Stärkekörner gebunden sein, die sich mit Jodlösung blau, mit Kalilauge oder Ammoniak blutrot färben sollen (?).

d) Hesperidin ($C_{21}H_{26}O_{12}$ oder $C_{50}H_{60}O_{27}$?).

§ 154. Das Hesperidin ist innerhalb der lebenden Pflanze im Zellsaft gelöst; es scheidet sich aber, wie das Inulin, innerhalb von Pflanzenteilen, die längere Zeit in Alkohol oder Glycerin aufbewahrt waren, in Form von Sphaerokrystallen ab. Geeignete Untersuchungsobjekte sind nach Pfeffer (III) namentlich unreife Apfelsinen.

Die Sphaerokrystalle des Hesperidins unterscheiden sich von denen des Inulins namentlich dadurch, dass sie häufig eine viel weniger abgerundete Form besitzen, wie diese und die Zusammensetzung aus einzelnen Krystallnadeln viel deutlicher erkennen lassen. Letzteres ist namentlich bei den kleineren Sphaeriten der Fall (cf. Fig. 28 a u. b); die grösseren enthalten in der Mitte meist einen mehr homogenen Kern, wie Fig. 28 c zeigt, die einen optischen Medianschnitt durch einen grösseren Sphaerokrystall darstellt.

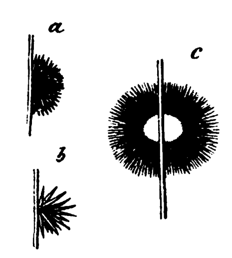


Fig. 28. Hesperidinkrystalle aus Alkoholmaterial von unreifen Früchten von Citrus Aurantium.

Die Hesperidinkrystalle lösen sich in alkoholischer oder wässeriger *Kalilauge* sehr leicht zu einer gelben Flüssigkeit, sind aber weder in kaltem oder heissem *Wasser*, noch in verdünnten *Säuren* merklich löslich, während das Inulin von kochendem Wasser sofort vollständig gelöst wird.

Die Sphaerokrystalle des Hesperidins sind ferner löslich in kochender konzentrierter *Essigsäure, Ammoniak* und wässeriger *Sodalösung,* aber unlöslich in *Aether, Benzol, Chloroform, Schwefelkohlenstoff* und *Aceton.* Beim *Glühen* werden sie vollständig verbrannt.

Die *Beobachtung* und *Konservierung* der Hesperidinsphaerokrystalle geschieht zweckmässig nach dem Aufhellen durch Nelkenöl in Canadabalsam. Namentlich für die Beobachtung im *polarisierten Lichte,* in dem sie das gleiche Bild geben, wie die Sphaerokrystalle des Inulins, sind Canada-Balsam-Präparate sehr geeignet.

e) Kaffeegerbsäure $C_{15}H_{18}O_{8}$.

§ 155. Die Kaffeegerbsäure zeigt nach Molisch (I, 9) folgende an Schnitten durch das Endosperm der Kaffeebohne leicht

unter dem Mikroskop zu beobachtenden Reaktionen: Mit *Eisenchlorid* wird sie dunkelgrün gefärbt, mit *Ammoniak* und *Kalilauge* intensiv gelb. Lässt man Schnitte mit einem Tropfen Ammoniak eintrocknen, so nehmen sie schliesslich eine grüne Farbe an, die beim Betupfen mit konzentrierter Schwefelsäure sofort in Rot umschlägt. Mit *Bleizucker* entsteht ein reichlicher Niederschlag.

f) Myronsaures Kali $C_{10}H_{18}NS_2O_{10}K$.

§ 156. Das in dem Samen zahlreicher Cruciferen enthaltene myronsaure Kali wird bekanntlich durch das Ferment Myrosin in Allylensenföl, Glykose und Kaliumsulfat gespalten. Zum mikrochemischen Nachweis desselben behandelt Guignard (II) Schnitte von dem zu untersuchenden Objekte zunächst mit Alkohol, der etwa vorhandenes fettes Oel löst und das Myrosin unwirksam macht, während das myronsaure Kali in Alkohol fast unlöslich ist. Werden die Schnitte dann in einen wässerigen Auszug des myrosinreichen weissen Senfsamens gebracht, so bildet sich in den myronsäurehaltigen Zellen Allylensenföl, das Guignard mit Hilfe von Alkannatinktur nachweist (cf. § 109).

g) Phloridzin $C_{21}H_{24}O_{10}$.

§ 157. Zum mikrochemischen Nachweise des Phloridzins benutzte O. Herrmann (I, 21) Lösungen von *Eisenchlorid* und *Eisenvitriol;* ersteres erzeugte eine dunkelrotbraune Lösung, letzteres eine gelbbraune Fällung. Diese Reaktionen führten jedoch nur bei Pirus Malus zu zuverlässigen Resultaten; bei der Birne, der Kirsche und der Pflaume wurden sie durch den gleichzeitig in grosser Menge vorhandenen eisengrünenden Gerbstoff allzu sehr verdeckt.

h) Ruberythrinsäure $C_{26}H_{28}O_{14}$.

§ 158. Die Ruberythrinsäure bildet den wichtigsten Bestandteil der in der Wurzel von Rubia tinctorum enthaltenen sogenannten *Krappfarbstoffe,* und zerfällt beim Kochen mit Salzsäure in Glykose und *Alizarin* (cf. Husemann I, 1387). Sie besitzt eine gelbe Farbe und ist, wie Nägeli und Schwendener (I, 502) gezeigt haben, in jungen Wurzeln ausschliesslich im Zellsaft gelöst, während die Membranen noch völlig farblos sind. In älteren Wurzeln sind jedoch ebenfalls die Membranen gefärbt, und zwar auch in solchen Zellen die sicher noch lebensfähig sind, wie

Nägeli und Schwendener durch Plasmolyse derselben nachweisen konnten.

Durch *Kalilauge* wird das Farbstoffgemisch von Rubia tinctorum purpurrot gefärbt, durch *Säuren* gelborange, durch *Eisenchlorid* orange bis bräunlich-rot. Beim Trocknen der Wurzeln wird es wahrscheinlich unter Mitwirkung eines Fermentes unter Bildung roter Flocken zersetzt.

i) Rutin $C_{42}H_{50}O_{25}$.

§ 159. Rutin findet sich nach O. Herrmann (I, 30) stets innerhalb des Zellinhaltes. Zum mikrochemischen Nachweis desselben empfiehlt der genannte Autor *Ammoniak* oder *Kalkwasser*, die mit Rutin eine intensiv gelbe Lösung bilden, die sich an der Luft braun färbt.

k) Safranfarbstoff (Crocin) $C_{44}H_{70}O_{28}$.

§ 160. Das im Safran enthaltene Crocin ist leicht löslich in *Wasser*, wenig löslich in *Alkohol*, nur spurenweise löslich in *Aether*. In konzentrierter *Schwefelsäure* löst es sich mit blauer Farbe, die bald violett und zuletzt braun wird, in konzentrierter *Salpetersäure* mit tiefblauer rasch braunwerdender Farbe (Beilstein III, 357). Nach Molisch (I, 57) sind die beiden letztgenannten Reaktionen auch sehr gut mikrochemisch zu verwenden.

l) Salicin $C_{13}H_{18}O_7$.

Salicin findet sich namentlich in der Rinde von Weiden und Pappeln. Durch konzentrierte *Schwefelsäure* wird dasselbe schön rot gefärbt (Rossol I, 8).

m) Saponin $C_{19}H_{30}O_{10}$.

§ 161. Das Saponin ist nach Rosoll (I, 11) innerhalb der lebenden Pflanze im Zellsaft gelöst, wird aber beim Austrocknen in Form amorpher Klumpen innerhalb der betreffenden Zellen gefällt, die in Oel oder Glycerin leicht beobachtet werden können. In *Wasser* oder stark verdünntem *Alkohol* werden sie gelöst, können aber aus dieser Lösung durch *Alkohol* oder *Aether* wieder niedergeschlagen werden.

Mit konzentrierter *Schwefelsäure* giebt das Saponin eine zunächst gelbe, dann lebhaft rote und schliesslich blauviolette Färbung.

Um einer Verwechselung mit der übrigens schon durch die

Färbung differierenden Raspail'schen Proteïnreaktion (cf. § 227) vorzubeugen, behandelt man zweckmässig zur Kontrolle Schnitte, die behufs Extraktion des Saponins mit Wasser gekocht waren, in der gleichen Weise mit konzentrierter Schwefelsäure.

n) Solanin $C_{42}H_{75}NO_{15}$.

§ 162. Nach Wothtschall (I), der eine grosse Anzahl von Reaktionen auf ihre Anwendbarkeit geprüft hat, sind nur folgende drei Reaktionen zum mikrochemischen Nachweis des Solanins geeignet.

1. Die Mandelin'*sche Reaktion.* Das zu dieser Reaktion dienende Reagenz wird zweckmässig frisch bereitet durch Lösen von 1 Teil *vanadinsaurem Ammon* in 1000 Teilen eines Gemisches von 98 Teilen konzentrierter *Schwefelsäure* und 36 Teilen Wasser. Dasselbe wird direkt den zu untersuchenden Schnitten zugesetzt. Bei Gegenwart von Solanin treten dann der Reihe nach folgende Farben auf: gelb, orange, purpurrot, bräunlichrot, karmin, himbeerrot, violett, blauviolett, blassgrünlichblau; schliesslich findet Entfärbung statt. Die Dauer, in der diese Farbenskala zurückgelegt wird, ist namentlich von der Konzentration der vorhandenen Lösungen abhängig, sie beträgt aber stets mehrere Stunden. Sollten in dem Präparate fette Oele vorhanden sein, die mit der konzentrierten Schwefelsäure ebenfalls Färbungen geben würden, so können dieselben durch vorheriges Eintauchen der Schnitte in Aether, in dem das Solanin so gut wie unlöslich ist, entfernt werden.

2. Die Brandt'*sche Reaktion.* 0,3 gr *selensaures Natrium* werden in einem Gemisch von 8 ccm Wasser und 6 ccm konzentrierter *Schwefelsäure* gelöst. Nach Zusatz dieses Reagenz zu den zu untersuchenden Schnitten wird das Präparat gelinde erwärmt, dadurch dass man es wiederholt über einer kleinen Flamme hin und herbewegt. Sobald die Färbung beginnt, muss das Erwärmen unterbrochen werden. Bei Gegenwart von Solanin tritt nun zunächst eine himbeerrote Färbung auf, die allmählich in Johannisbeerrot übergeht, das bald blässer und mehr bräunlichgelb wird, schliesslich vollständig verschwindet.

3. *Schwefelsäure.* Nach Zusatz konzentrierter Schwefelsäure gibt das Solanin zunächst eine hellgelbe Färbung, die allmählich röther wird, dann eine violette Nuance erhält, allmählich erblasst, ins grünliche übergeht und schliesslich völlig verschwindet.

Zur Konservierung Solanin enthaltender Pflanzen empfiehlt Wothtschall (I, 186) dieselben einfach zu trocknen.

o) Syringin $C_{17}H_{24}O_9 + H_2O$.

§ 163. Syringin findet sich nach Borscow (I, 36) bei Zweigen von Syringa vulgaris innerhalb der dickwandigen Elemente des Phloëms und des Xylems, sowie in den Markstrahlen und zwar nur in den Zellhäuten. Zum mikrochemischen Nachweis desselben benutzt der genannte Autor ein Gemisch von 1 Teil konzentrierter *Schwefelsäure* und 2 Teilen Wasser. Dasselbe wird zarten Längs- oder Querschnitten zugesetzt und färbt die Syringin-haltigen Membranen zunächst gelbgrün, nach wenigen Minuten blau und schliesslich violett-rot.

p) Glykosid (?) aus dem reizleitenden Gewebesystem von Mimosa pudica.

§ 164. Von Haberlandt (I, 17) wurde beobachtet, dass aus den Flüssigkeitstropfen, die bei Mimosa pudica beim Anschneiden des Stengels oder Blattstieles austreten, beim Austrocknen in beträchtlicher Menge eine Substanz auskrystallisiert, deren genaue Zusammensetzung bisher zwar noch nicht ermittelt werden konnte, die aber nach ihren Reaktionen am ersten zu den Glykosiden gerechnet werden dürfte.

Die Krystalle dieser Substanz sind stets schwach bräunlich gefärbt und zeigen eine sehr verschiedene Gestalt: sie bilden bald grosse Prismen oder kreuzförmige Zwillinge, bald drusige Aggregate oder dendritische Körper, auch sphaeritische Bildungen wurden beobachtet. Die stoffliche Identität dieser verschiedenen Gebilde geht daraus hervor, dass sie sich sämtlich in *Eisenchlorid* mit rotvioletter Farbe lösen. Sie sind ferner leicht löslich in *Wasser*, sehr schwer löslich in *Alkohol*, in *Aether* ganz oder nahezu unlöslich. Von *konzentrierter Schwefelsäure* werden sie mit gelbgrünlicher Farbe gelöst, welche beim Erwärmen in rotbraun übergeht. *Verdünnte Schwefelsäure* und *Salzsäure* fällen in ihrer wässerigen Lösung einen feinkörnigen weissen Niederschlag, der in Alkohol löslich ist. *Eisenvitriol* bewirkt eine intensiv rostrote Färbung. *Bleizucker* erzeugt in der wässerigen Lösung einen voluminösen gelblichen Niederschlag, welcher in Essigsäure löslich ist. Fehling'*sche Lösung* reduziert die betreffende Substanz direkt nicht, wohl aber nach dem Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure.

Da übrigens eine Isolierung der fraglichen Substanz bisher nicht ausgeführt wurde, muss es bei mehreren der genannten Reaktionen zweifelhaft bleiben, in wie weit dieselben durch andere gleichzeitig in jenen Flüssigkeitstropfen enthaltene Stoffe beeinflusst wurden.

7. Bitterstoffe und indifferente Stoffe.

a) Calycin $C_{18}H_{12}O_6$.

§ 165. Calycin findet sich in Form gelber Kryställchen den Membranen von Calycium chrysocephalum und verschiedenen anderen Flechten aufgelagert. Zum mikrochemischen Nachweis desselben verfährt man nach Bachmann (V) am zweckmässigsten in der Weise, dass man ein möglichst fein zerriebenes Stückchen von der betreffenden Flechte mit *Eisessig* betupft, dann die Flüssigkeit zu einem Tropfen zusammenfliessen und verdunsten lässt. Das Calycin krystallisiert dann in langen, nadelförmigen, stark doppelbrechenden Krystallen aus.

Ausserdem ist charakteristisch für das Calycin, dass es durch *Kalilauge* nicht gelöst wird und auch keine Aenderung der Färbung erfährt.

b) Spergulin $(C_6H_7O_2)x$.

§ 166. Von Harz (II) wurde aus den Samenschalen von Spergula vulgaris und Spergula maxima eine stark fluoreszierende Substanz isoliert, die er als Spergulin bezeichnete. Dasselbe ist leicht löslich in absolutem und wasserhaltigem *Alkohol* und erscheint in dieser Lösung farblos oder schwach grünlich oder olivenbraun und zeigt eine intensiv dunkelblaue *Fluoreszenz*, während nach Zusatz geringer Mengen Alkalis schön smaragdgrüne Fluoreszenz eintritt. Es ist aus dieser Lösung nicht in krystallinischer Form zu erhalten.

Charakteristisch ist für das Spergulin ferner, dass es sich in *konzentrierter Schwefelsäure mit schön dunkelblauer Farbe löst.* Es ist ferner leicht löslich in *Methylalkohol*, schwieriger in *Amylalkohol*, kaum in *Petroleum* und *Aether;* es ist unlöslich in *fetten* und *ätherischen Oelen,* in *Benzin, Schwefelkohlenstoff, Chloroform, Phenol,* kaltem und heissem *Wasser*, verdünnten *organischen* und *anorganischen Säuren.*

Da die Membranen der stark verdickten äussersten Zellschicht der Samenschale sich in Schwefelsäure mit intensiv blauer Farbe

lösen, nimmt Harz an, dass das Spergulin in den Membranen selbst enthalten ist.

8. Farbstoffe.

§ 167. Die in diesem Abschnitte vereinigten Verbindungen bilden keineswegs eine Gruppe chemisch verwandter Stoffe, vielmehr sind in derselben alle gefärbten Stoffe vereinigt, deren chemische Konstitution noch zu wenig erforscht ist, um eine Unterbringung derselben im natürlichen System der organischen Verbindungen zu ermöglichen. Ueber die meisten derselben sind denn auch unsere Kenntnisse noch äusserst lückenhaft, eine wirkliche Isolierung und quantitative Analyse ist bisher nur bei wenigen mit einiger Exaktheit ausgeführt.

Es kann nun nicht meine Aufgabe sein, alle bisher aus verschiedenen Pflanzenteilen extrahierten Farbstoffe aufzuzählen; vielmehr glaubte ich mich auf diejenigen beschränken zu sollen, über deren chemisches Verhalten einigermassen zuverlässige Angaben vorliegen und die namentlich auch mikrochemisch mit einiger Sicherheit nachweisbar sind.

Die Gruppierung der Farbstoffe habe ich nach dem Orte, an dem sie sich innerhalb der lebenden Pflanze befinden, ausgeführt.

a) Die Pigmente der Chromatophoren.

§ 168. Die verschiedenen Färbungen der Chromatophoren sind nach den vorliegenden Untersuchungen, wenn wir vorläufig von den nicht grünen Algen absehen, auf eine relativ kleine Anzahl von Farbstoffen zurückzuführen, die aber zur Zeit noch zu wenig erforscht sind, um schon jetzt eine vollkommen sichere Abgrenzung möglich zu machen. Mit einiger Sicherheit lassen sich bisher nur 4 Farbstoffe unterscheiden, und ich will mich hier auch auf die kurze Besprechung derselben beschränken. Ein spezielleres Eingehen auf die sehr umfangreiche Chlorophyllliteratur etc. scheint mir an dieser Stelle um so weniger geboten, als dieselbe fast ausschliesslich makroskopische Untersuchungen enthält und auch bisher erst sehr wenig zu physiologisch verwertbaren Resultaten geführt hat.

Nach Besprechung dieser vier Pigmente sollen dann die Chromatophoren-Farbstoffe der nicht grünen Algen abgehandelt werden.

α) Chlorophyllgrün.

§ 169. Als Chlorophyllgrün oder Chlorophyll bezeichnet man gewöhnlich den grünen Farbstoff der Chloroplasten oder Chlorophyllkörper, die sämtlich ein und demselben Farbstoffe ihre grüne Farbe zu verdanken scheinen. *Makrochemisch* nachgewiesen wird das Chlorophyll namentlich durch die starke rote *Fluoreszenz* und durch sein *Absorptionspektrum*, in dem man abgesehen von der im Blau beginnenden Endabsorption 4 Bänder unterscheidet, von denen namentlich das starke Absorptionsband im Rot charakteristisch ist. Da jedoch ein anderer grüner Farbstoff innerhalb der Chromatophoren bisher nicht beobachtet wurde, kann bei der *mikroskopischen* Beobachtung wohl nur bei schwach gefärbten Chloroplasten ein Zweifel über das Vorhandensein von Chlorophyll bestehen; in solchen Fällen hat man nun wohl die sogenannte *Hypochlorin*- oder *Chlorophyllanreaktion* zum Nachweis von Chlorophyllgrün angewandt; diese Reaktion wird nach A. Meyer (II) am besten in der Weise ausgeführt, dass man zu Schnitten von den betreffenden Pflanzenteilen unter dem Deckglase *Eisessig* zufliessen lässt; es scheiden sich dann bald krystallinische, bald amorphe Massen, die Zersetzungsprodukte des Chlorophylls enthalten, an der Oberfläche der Chromatophoren ab. Bezüglich der weiteren Reaktionen des Hypochlorins vergl. A. Meyer (II).

β) Carotin (Chlorophyllgelb).

§ 170. Das Carotin wurde zuerst aus den Rüben von Daucus Carota dargestellt, wo es sich in Form von rhombischen Tafeln oder verschiedenartig gestalteten krystallinischen Bildungen vorfindet (cf. § 356). Die gleiche Substanz findet sich ferner innerhalb der orange- oder rotgefärbten Chromatophoren zahlreicher Blüten und Früchte. Ausserdem ist sie aber nach den Untersuchungen von Arnaud (II) auch innerhalb der Chloroplasten konstant anzutreffen, die nach Immendorff (I) ausser dem Carotin keinen gelben oder gelbroten Farbstoff enthalten. Das Carotin wäre somit identisch mit den als *Chlorophyllgelb, Xanthophyll, Erythrophyll*, *Chrysophyll* etc. bezeichneten Farbstoffen. Nach Immendorff (I, 516) findet sich das Carotin auch innerhalb der Chromatophoren etiolierter Pflanzenteile und ist ferner die Ursache der herbstlichen Gelbfärbung der Blätter.

§ 171. Die *elementare Zusammensetzung* des Carotins ent-

spricht nach Arnaud (I) der Formel $C_{26}H_{38}$; dasselbe würde also auffallender Weise einen Kohlenwasserstoff darstellen. Es wird nach Immendorff (I, 510) aus der Schwefelkohlenstofflösung, die es intensiv blutrot färbt, durch Alkohol in glänzenden tiefroten Krystallen abgeschieden, die im unzersetzten Zustande starken *Dichroismus* (cf. § 356 Anm.) zeigen; beim Liegen an der Luft gehen diese Krystalle aber unter Sauerstoffaufnahme allmählich in eine farblose in Alkohol leicht lösliche Verbindung über; beim Erwärmen nehmen sie zunächst eine ziegelrote Farbe an, oberhalb 160° schmelzen sie.

Sehr mannigfaltig gestaltete Krystalle von Carotin hat auch Courchet (I) aus verschiedenen Pflanzenteilen dargestellt, die wie die natürlich beobachteten Krystalle bald eine mehr rote, bald eine mehr gelbe Farbe zeigten. Worauf diese Färbungsverschiedenheiten, die bei der Möhre innerhalb ein und derselben Zelle zu beobachten sind, zurückzuführen sind, ist noch nicht entschieden. Ebenso ist noch festzustellen, ob alle als Carotin bezeichneten Farbstoffe identisch sind; immerhin ist es wahrscheinlich, dass wir es hier zum mindesten mit einer Gruppe nahe verwandter Farbstoffe zu thun haben.

§ 172. Zum mikrochemischen Nachweis des Carotins können nun namentlich folgende Reaktionen dienen: Mit *Jodlösung* (z. B. wässeriger Jodjodkaliumlösung) färbt es sich grünlich bis grünlichblau, mit konzentrierter *Schwefelsäure* erst violett dann indigoblau, aus der intensiv blauen Lösung in konzentrierter Schwefelsäure wird es nach Immendorff (I, 509) durch Wasserzusatz in grünen nicht krystallisierenden Flocken wieder ausgefällt.

Ferner ist das Carotin nach Arnaud (I) unlöslich in *Wasser*, fast unlöslich in *Alkohol*, sehr wenig löslich in *Aether*, leichter löslich in *Benzin*, am besten in *Chloroform* und *Schwefelkohlenstoff*.

Diese Lösungen sind auch bei den karminroten Krystallen je nach der Konzentration gelb oder orangegelb gefärbt, während die Lösung des Carotins in *Schwefelkohlenstoff*, wie bereits erwähnt wurde, stets blutrot gefärbt ist.

Das *Absorptionsspektrum* des Carotins zeigt nach Immendorff (I, 510) zwei Bänder im Blau und Absorption des Violett.

γ) Xanthin.

§ 173. Xanthin findet sich innerhalb der *gelben* Chromoplasten, in denen es stets in amorpher Form, namentlich in Form

kleiner Kugeln (grana) auftritt (cf. § 357); auch die alkoholische Lösung hinterlässt nach Courchet (I, 349), beim Eindampfen eine gänzlich amorphe harzartige Masse. Es ist unlöslich in *Wasser*, wenig löslich in *Aether, Chloroform* und *Benzin,* mehr löslich in *Alkohol.* Mit konzentrierter *Schwefelsäure* färbt sich das isolierte Pigment sowohl wie die Chromoplasten erst grünlich, dann blau, mit *Jod,* das zweckmässig als Jodjodkaliumlösung zugesetzt wird, grün.

δ) Farbstoff der Aloë-Blüten.

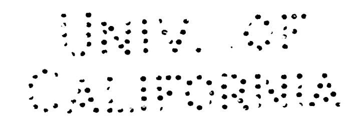
§ 174. Ein Farbstoff, dessen Reaktionen von denen des Xanthins und Carotins wesentlich abweichen, wurde von Courchet (I) in den Chromoplasten der Blüten von Aloë nachgewiesen. Derselbe ist unlöslich in *Aether* und *Chloroform,* dagegen leicht löslich in *Alkohol* und zwar mit johannisbeerroter Farbe; beim Verdünnen wird diese Lösung rosafarben, *Benzin* nimmt aus derselben nur wenig auf, in krystallinischer Form konnte es bisher nicht erhalten werden. Es färbt sich mit *Schwefelsäure* gelbgrün, ungefähr ebenso mit *Salzsäure,* mit *Salpetersäure* erst gelb und wird dann zersetzt. *Kalilauge* färbt die Farbstoffgrana orange und bewirkt ein Zusammenfliessen derselben, *Jod* färbt sie schmutzig gelb.

Bei anderen Pflanzen wurde dieser Farbstoff bisher nicht beobachtet.

ε) Die Farbstoffe der Florideen-Chromatophoren.

§ 175. In den Chromathophoren der Florideen findet sich einerseits ein in Wasser lösliches rotgefärbtes Pigment, andererseits ein in Alkohol löslicher grüner Farbstoff. Der letztere ist höchst wahrscheinlich mit dem *Chlorophyll* identisch. Der in Wasser lösliche Farbstoff wird zur Zeit gewöhnlich als *Phycoërythrin* bezeichnet.

Das *Phycoërythrin* ist nach Schütt (II u. IV) unlöslich in *Alkohol*, *Aether, Benzol, Benzin, Schwefelkohlenstoff, Eisessig* und *fettem Oele.* Die gesättigte wässerige Lösung desselben erscheint im durchfallenden Lichte dunkelbläulichrot, im auffallenden mehr oder weniger gelb infolge intensiver orangegelber Fluorescenz. Das Absorptionsspektrum derselben unterscheidet sich nach den Untersuchungen von Schütt (II) von dem des Chlorophylls namentlich dadurch, dass es an *der* Stelle vom Rot, an der das stärkste Absorptionsband des Chlorophylls liegt, ein Helligkeitsmaximum besitzt.



ζ) Farbstoffe der Phaeophyceen.

§ 176. In den Chromatophoren der Phaeophyceen wurden von Millardet drei Farbstoffe nachgewiesen: das *Chlorophyllin*, das *Phycoxanthin* und das *Phycophaein*. Von diesen sind die ersteren beiden nach Hansen (II) identisch mit dem Chlorophyllgrün und Chlorophyllgelb, resp. *Chlorophyll* und *Carotin*.

Das *Phycophaein* ist leicht löslich in *Wasser* (namentlich in heissem); die gesättigte Lösung besitzt eine intensiv rotbraune Färbung und zeigt im Spektralapparat ein gleichmässiges Ansteigen der Absorption beim Fortschreiten vom roten zum blauen Ende des Spektrums, ohne irgendwelche Absorptionsmaxima. Es ist ferner wenig löslich in verdünntem, unlöslich in absolutem *Alkohol*, ebenso unlöslich in *Aether*, *Schwefelkohlenstoff*, *Benzol*, *Benzin* und *fettem Oel*. Es wird durch *Säuren* mehr oder weniger vollkommen aus seiner wässerigen Lösung gefällt, unvollständig auch durch *Natronlauge*, durch *Ammoniak* und durch *Salze der Alkalien* dagegen nicht. *Salze der alkalischen Erden* fällen es (Schütt, III).

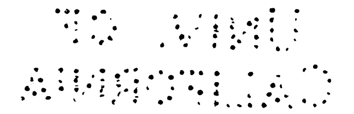
η) Farbstoffe der Cyanophyceen.

§ 177. Aus einer Oscillaria wurden von Reinke (II, 405) drei verschiedene Farbstoffe isoliert, die derselbe als *Chlorophyll*, *Phycoxanthin* und *Phycocyan* bezeichnet. Von diesen dürfte das erstere wohl sicher mit dem gewöhnlichen Chlorophyll identisch sein; ob aber das Phycoxanthin mit dem Carotin zu identifizieren ist, bedarf noch weiterer Untersuchungen, nach den Angaben von Reinke ist dies jedoch nicht sehr wahrscheinlich.

Das *Phycocyan* ist in *Wasser* löslich, und besitzt in dieser Lösung eine hellblaue Farbe mit roter Fluorescenz, das Absorptionsspektrum derselben zeigt nach Reinke vier Bänder.

ϑ) Die Farbstoffe der Diatomeen.

§ 178. Die im lebenden Zustande gelbbraungefärbten Chromatophoren der Diatomeen, werden wie schon Nägeli gezeigt hat, durch *Alkalien* und verdünnte *Säuren* grünlich, durch konzentrierte *Schwefelsäure* schön spangrün gefärbt. Sie enthalten zum mindesten zwei Farbstoffe, von denen der eine wohl sicher mit dem Chlorophyll identisch ist, während der andere vielfach als *Phycoxanthin*, zweckmässiger aber wohl als *Diatomin* bezeichnet wird.



Das *Diatomin* ist dadurch ausgezeichnet, dass es schon in verdünntem Alkohol mit braungelber Farbe löslich ist. Dass es mit dem *Carotin* identisch sein sollte, ist nach den vorliegenden Untersuchungen nicht wahrscheinlich (cf. Askenasy I, 236 und Nebelung I, 394).

ι) Farbstoffe der Peridineen.

§ 179. Die Peridineen, die neuerdings gewöhnlich zu den Algen gerechnet werden, sind, wie Klebs (V, 732) gezeigt hat, durch den Besitz echter Chromatophoren ausgezeichnet. Dieselben enthalten nach Schütt (I) drei Pigmente, die dieser Autor als *Peridineen-Chlorophyllin*, *Peridinin* und *Phycopyrrin* bezeichnet. Von diesen ist das Peridineen-Chlorophillin mit dem Chlorophyll entweder identisch oder wenigstens sehr nahe verwandt.

1. Das *Peridinin* ist in *Wasser* unlöslich, aber in *Alkohol* leicht zu einer rotweinfarbigen Flüssigkeit löslich; es ist ferner leicht löslich in *Aether, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff* und *Eisessig*. Das Absorptionsspektrum desselben zeigt nach Schütt (I) das zwischen B und C gelegene Band I des Chlorophylls und ist ausserdem durch eine starke Absorption im Grüngelb ausgezeichnet.

2. Das *Phycopyrrin* (von πυρρός rotbraun) ist in *Wasser* zu einer dunkelbraunroten Flüssigkeit löslich; es ist ferner leicht löslich in *Alkohol, Aether, Schwefelkohlenstoff* und *Benzol*. Das Absorptionsspektrum der wässerigen Lösung besitzt nach Schütt eine gewisse Aehnlichkeit mit dem Chlorophyllspektrum, insofern es auch das Chlorophyllband I zeigt.

b) Fettfarbstoffe oder Lipochrome.

§ 180. Als Fettfarbstoffe oder Lipochrome bezeichnet man zur Zeit alle diejenigen gelben oder roten Farbstoffe, die durch *Schwefelsäure* und durch *Salpetersäure* blau, durch *Jodjodkaliumlösungen* grün gefärbt werden. Innerhalb der lebenden Zellen sind sie meist in fettartigen Substanzen gelöst.

Von Zopf (IV) wurde neuerdings namentlich das Verhalten der Lipochrome gegen *Schwefelsäure* untersucht und der Nachweis geliefert, dass bei dieser Reaktion, häufig tiefblau gefärbte Krystalle auftreten, die dieser Autor als *Lipocyankrystalle* bezeichnet. Dieselben bilden sich namentlich, wenn zu dem Rückstande der auf dem Objektträger eingedampften Lösung des Li-

pochroms wenig konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt wird. Uebrigens gelang es Zopf auch direkt aus verschiedenen Organen die Lipocyankrystalle zu gewinnen, namentlich wenn er die betreffenden Schnitte vor dem Schwefelsäure-Zusatz austrocknen liess.

§ 181. Zu den Lipochromen gehören nun nach ihrem chemischen Verhalten zunächst die bereits besprochenen Chromatophoren-Farbstoffe *Carotin* und *Xanthin* (cf. § 170 u. 173). Ferner gehört hierher der von Cohn aus den Zellen von Haematococcus dargestellte rote Farbstoff, den dieser als *Haematochrom* bezeichnet. Auch der von Rostafinsky (I) als *Chlororufin* bezeichnete Farbstoff ist hierher zu rechnen. Sodann wurden auch von Zopf und Bachmann aus verschiedenen Pilzen verschiedenartige Lipochrome dargestellt (cf. Zopf II, 414). Endlich ist auch das von Lankaster aus verschiedenen rotgefärbten Bakterien dargestellte *Bacteriopurpurin* nach Bütschli (I, 9) zu den Lipochromen zu stellen, dasselbe würde sogar nach den von diesem Autor angeführten Reaktionen mit dem Haematochrom Cohn's identisch sein.

Ob nun übrigens alle diese Farbstoffe mit einander in naher chemischer Verwandtschaft stehen und inwieweit sie mit einander identisch sind oder umgekehrt aus Gruppen mehr oder weniger verschiedenartiger Farbstoffe bestehen, muss noch durch weitere Untersuchungen festgestellt werden.

c) Andere in Fetten oder ätherischen Oelen gelöste Farbstoffe.

Von anderen nach ihren chemischen Reaktionen sicher nicht zu den Lipochromen gehörigen Farbstoffen, die in der lebenden Pflanze in fetten oder ätherischen Oelen gelöst vorkommen, wurde bisher nur das *Curcumin* mikrochemisch untersucht.

Curcumin $C_{14}H_{44}O_{1}$.

§ 182. Curcumin findet sich nach den Untersuchungen von O. Herrmann (I, 24) im frischen Rhizom von Curcuma amata innerhalb der parenchymatischen Zellen des Grundgewebes und zwar ist es hier in einem ätherischen Oele gelöst. Zum mikrochemischen Nachweis derselben benutzte der genannte Autor einerseits *Bleiacetat*, mit dem das Curcumin einen ziegelroten Niederschlag bildet, andererseits *Schwefelsäure*, die dasselbe karmoisinrot färbt.

d) Die im Zellsaft gelösten Farbstoffe.

§ 183. Die im Zellsaft gelösten Farbstoffe sind bisher noch wenig untersucht; man unterscheidet hier gewöhnlich nur zwei verschiedene Farbstoffe oder Gruppen nahe verwandter Verbindungen, nämlich das *Anthocyan* oder *Cyanin* und das *Anthochlor* oder *Xantheïn*. Von diesen bewirkt das erstere die roten, blauen oder blaugrünen Färbungen, während das letztere die gelben oder gelbbraunen Farbentöne erzeugt.

α) Anthocyan.

§ 184. Das Anthocyan ist in *Wasser* leicht löslich und besitzt in dieser Lösung, je nachdem dieselbe mehr sauer oder alkalisch reagiert, eine rote, violette, blaue, blaugrüne, grüne oder gelbgrüne Färbung. Durch starke Alkalien wird es gänzlich entfärbt.

Das Anthocyan ist ferner löslich in *Alkohol* und *Aether*.

Ob übrigens alle als Anthocyan bezeichneten Farbstoffe chemisch identisch sind, muss noch durch genauere Untersuchungen festgestellt werden. Hansen (III) spricht sich zwar auf Grund spektroskopischer Untersuchungen für die Identität der aus verschiedenen Organen dargestellten roten und blauen Farbstoffe aus.

Dahingegen hat N. J. C. Müller (I) neuerdings nachzuweisen gesucht, dass eine beträchtliche Anzahl sehr verschiedenartiger Verbindungen bisher als Anthocyan bezeichnet wurde. Da jedoch der genannte Autor über die Darstellungsweise der ausser in ihrem Verhalten gegen Kalilauge und Schwefelsäure nur noch spektroskopisch geprüften Farblösungen gar keine Angaben macht, bleibt unentschieden, in wieweit das verschiedene Verhalten derselben fremdartigen Beimengungen zuzuschreiben ist.

Erwähnen will ich an dieser Stelle noch, dass bei verschiedenen Pflanzen auch *Farbstoffausscheidungen* von blauer oder violetter Färbung und körniger oder krystallinischer Struktur beobachtet wurden. Dieselben bestehen höchst wahrscheinlich aus einer Verbindung des Anthocyans mit einer anderen bisher nicht ermittelten Substanz, vielleicht einem Gerbstoffe.

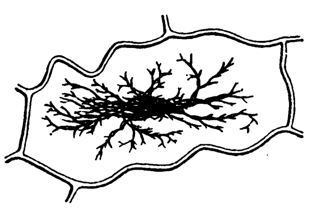


Fig. 29. Epidermiszelle von dem Blumenblatte von Delphinium formosum.

Sehr schön beobachtet man diese Farbstoffausscheidungen z. B. in der

Blumenblattepidermis der verschiedenen Delphiniumarten. In der in Fig. 29 abgebildeten Zelle aus der Epidermis des Blumenblattes von Delphinium formosum lagen die schön blau gefärbten Ausscheidungen, die offenbar aus zarten Nadeln bestehen, innerhalb des violett gefärbten Zellsaftes. Uebrigens zeigen an dem beschriebenen Orte die Farbstoffausscheidungen die verschiedenartigsten Gestalten.

β) Anthochlor.

§ 185. Die gelben im Zellsaft gelösten Farbstoffe unterscheiden sich nach Courchet (I, 361 u. 362) sämtlich dadurch von dem in den Chromatophoren enthaltenen Xanthin, dass sie sich mit konzentrierter *Schwefelsäure* niemals blau färben. Im Uebrigen zeigen, wie ebenfalls von Courchet nachgewiesen wurde, die bei verschiedenen Pflanzen im Zellsaft enthaltenen gelben Farbstoffe gegen chemische Reagentien ein sehr verschiedenes Verhalten. Die zur Zeit vorliegenden Untersuchungen sind aber noch zu lückenhaft, um schon jetzt eine Klassifizierung derselben zu ermöglichen.

e) Farbstoffe, die zunächst im Zellinhalt enthalten sind, später aber die Membran durchtränken.

§ 186. In diese Kategorie gehören nach Sanio (II, 202), Nägeli und Schwendener (I, 501) und Praël (I, 67) alle oder wenigstens die meisten Farbstoffe der Farbhölzer. Es folgt dies schon mit grosser Wahrscheinlichkeit aus der Untersuchung der trockenen Hölzer, die meist im Lumen der Markstrahl- und Holzparenchymzellen Körnchen von den gleichen Eigenschaften, wie sie die die Membranen inkrustierenden Farbstoffe besitzen, enthalten.

Genauer untersucht wurden in dieser Hinsicht ferner von Nägeli und Schwendener die *Krappfarbstoffe* und das *Berberin,* die aber neuerdings an anderen Stellen des Systems der organischen Verbindungen eingeordnet wurden (cf. § 158 u. 212).

§ 187. Nach den Untersuchungen von A. Rosoll (I, 137) gehört jedoch in diese Gruppe auch der in den *Hüllblättern verschiedener Helichrysum-Arten enthaltene gelbe Farbstoff,* den dieser Autor als *Helichrysin* bezeichnet. Derselbe soll nach Rosoll in jungen Blättchen an das Plasma gebunden sein und erst bei alten Zellen in die Membran eindringen. Eine makrochemische

Untersuchung des Helichrysins fehlt zur Zeit noch, mikrochemisch ist dasselbe aber dadurch charakterisiert, dass es in *kaltem Wasser* schwer, in *heissem Wasser* aber und ebenso in *Alkohol, Aether organischen Säuren* leicht löslich ist. Dagegen ist es unlöslich in *Benzol, Chloroform* und *Schwefelkohlenstoff. Mineralsäuren* sowohl wie *Alkalien* färben dasselbe schön purpurrot. *Essigsaures Blei* fällt den Farbstoff aus der Lösung mit roter Farbe.

§ 188. Ferner ist es nach den Untersuchungen von Nägeli und Schwendener (I, 504) wahrscheinlich, dass auch das *Anthocyan* unter Umständen die Membranen inkrustieren kann. Wenigstens zeigte der aus der *Samenschale von Abrus precatorius* extrahierte Farbstoff gegen Säuren und Alkalien ein mit dem des Anthocyans übereinstimmendes Verhalten, während auf der anderen Seite vollständig ausgewaschene Membranen durch den aus roten Blumenblättern ausgepressten Zellsaft intensiv tingiert wurden.

f) Farbstoffe, welche nur eingelagert in die Membran vorkommen.

§ 189. Farbstoffe von den oben genannten Eigenschaften sind bei den niederen Pflanzen sehr verbreitet. So findet man zunächst bei den *Cyanophyceen* nach den Untersuchungen von Nägeli und Schwendener (I, 505) zwei Farbstoffe, das *Gloeocapsin* und das *Scytonemin,* die in ihrem Vorkommen vollständig auf die Membran beschränkt sind und im Inhalt der betreffenden Zellen niemals vorkommen, so dass man annehmen muss, dass sie direkt in den Membranen gebildet werden.

Das *Gloeocapsin* ist rot bis blau, durch *Salzsäure* wird es rot (schön rosenrot, rotorange oder bläulichrot), durch *Kalilauge* blau oder blauviolett. Es findet sich vorzüglich bei Gloeocapsa.

Das *Scytonemin* verleiht den Membranen von Scytomena und verschiedenen anderen Algen eine gelbe bis dunkelbraune Färbung. Ueber die Eigenschaften desselben liegen neuere Untersuchungen von Correns (I, 30) vor. Nach diesen ist das Scytonemin namentlich dadurch ausgezeichnet, dass es mit *Chlorzinkjod,* sowie auch mit *Jod* und *Schwefelsäure,* eine blauviolette Färbung annimmt, die mit der bei der Cellulosereaktion auftretenden Färbung eine grosse Aehnlichkeit besitzt. Durch *Eau de Javelle* (cf. § 12, 4) wird das Scytonemin zerstört und die so be-

handelten Fäden färben sich dem entsprechend mit den erwähnten Jodreagentien nicht mehr.

Mit *Säuren* nimmt das Scytonemin eine grüne Färbung an, die durch Neutralisation wieder in die ursprüngliche Nuance verwandelt wird. Auch *schweflige Säure* wirkt in dieser Weise und zerstört den Farbstoff nicht.

Alkalien färben das Scytonemin mehr rotbraun. Scheiden die mit *Kalilauge* behandelt waren, färbten sich nach Correns, obwohl nach dem Auswaschen der Farbstoff scheinbar unverändert war, mit Chlorzinkjod nicht mehr grauviolett.

Makrochemische Untersuchungen über die Zusammensetzung dieser Stoffe fehlen zur Zeit noch gänzlich.

§ 190. Sehr zahlreiche verschiedene Farbstoffe finden sich ferner nach den Untersuchungen von Bachmann (II) und Zopf (V) innerhalb der Membranen der *Pilze*. Da dieselben aber bisher fast ausschliesslich nur ihrem makroskopischen Verhalten nach untersucht wurden und auch über ihre chemische Zusammensetzung bisher nur sehr wenig festgestellt wurde, sei bezüglich derselben auf die Zusammenstellung von Zopf (II, 418) verwiesen.

§ 191. Die den Membranen der *Flechten* eingelagerten Farbstoffe wurden neuerdings von Bachmann (IV) näher untersucht. Dieser Autor unterscheidet nach dem mikrochemischen Verhalten derselben 16 verschiedene Farbstoffe, deren wichtigste Reaktionen in der auf der nachfolgenden Seite befindlichen Tabelle zusammengestellt sind.

g) Farbstoffe, welche der Membran aufgelagert sind.

§ 192. Bei zahlreichen *Flechten* finden sich gefärbte Verbindungen, die den Membranen derselben äusserlich anhaften. Dieselben sind meist krystallinisch, seltener amorph.

Amorphe Farbstoffexkrete fand Bachmann (IV, 27) nur bei zwei Flechten, er bezeichnete dieselben nach dem Namen der betreffenden Flechte als Arthoniaviolett und Urceolariarot.

Das *Arthoniaviolett* findet sich in allen Teilen von Arthonia gregaria und ist namentlich dadurch ausgezeichnet, dass es in *kaltem Wasser* etwas, in *heissem* aber leicht löslich ist. Auch in *Alkohol* ist es löslich und zwar mit weinroter Farbe. Von *Kalilauge* wird es mit violetter Farbe gelöst; in *Kalk-* und *Barytwasser* ist es unlöslich; in *Schwefelsäure* ist es mit indigoblauer,

Tabelle zu § 191 (Reaktionen der Flechtenfarbstoffe).

Name des Farbstoffes oder der ihn führenden Flechte	Aussehen des Farbstoffes	KOH	NH_3	$Ba(OH)_2$	NO_3H	SO_4H_2	Spezialreaktionen:
Lecideagrün	grün				kupfer- bis weinrot		erst KOH dann ClH : blau
Aspilciliagrün	grün						NO_3H: lebhafter und reiner grün
Bacidiagrün	grün				violett		ClH : violett
Thalloidimagrün	grün	violett			undeutlich purpurrot		ClH : undeutlich purpurrot
Rhizoidengrün	bläulichgrün	olivengrün bis braun			olivengrün		
Biatora atrofusca	blau	löst mit grünblauer Farbe			violett, dann gelb, endlich Entfärbung	löst auf	H_2O : unlöslich
Phialopsis rubra	ziegelrot		färben trüb purpurrot		färbt violett		
Lecanorarot	purpurrot		färben tief violett		färbt heller		
Sagedia declivum	bläulichrot	blau (grün)	erst grünblau dann grauschwärzlich	blau			
Verrucaria Hoffmanni f. purpurascens	rosenrot		dunkelgrün				erst KOH, dann NO_3H, dann SO_4H_2: violette Krystalle.
Bacidia fusco rubella	gelb bräunlich		violett				
Sphaeromphale clopismoides	lederbraun	intensiv olivengrün					erst KOH, dann SO_4H_2, dann NO_3H: schwärzlich
Segestria lectissima, Perithecien	gelbbraun	morgenrot			hellgelb		verd. SO_4H_2: hellgelb
Segestria lectissima, das ganze Gewebe	braun u. farblos						konz. SO_4H_2: intensiv violett, endlich grau
Parmelia glomellifera	lederbraun				blau, dann violett endlich grau		Cl_2O_2Ca: erst blau, dann grau, endlich entfärbt.
Parmeliabraun	gelb bis schwarzbraun	schmutzig- bis olivenbraun			hell rotbraun.		

später ins Malvenrote übergehender Farbe löslich, in *Salpetersäure* mit roter Farbe.

Urceolariarot findet sich im Thallus von Urceolaria ocellata. Mikrochemisch ist dasselbe dadurch charakterisiert, dass es durch *Alkohol* nicht verändert wird, von *Kalilauge* und *Barytwasser*, sowie von konzentrierter *Salpeter-* und *Schwefelsäure* mit gelbbrauner Farbe aufgelöst wird, *Chlorkalklösung* entfärbt dasselbe, *Kalkwasser* und *Ammoniumkarbonat* bringen keine Veränderung an demselben hervor.

§ 193. Zu den krystallinischen Exkreten der *Flechtenpilze* gehören zunächst das schon an anderer Stelle besprochene *Emodin,* die *Chrysophansäure* und das *Calycin* (cf. § 140, 141 u. 165), ferner noch eine Reihe von anderen sogenannten Flechtensäuren, die bisher aber fast ausschliesslich nur makroskopisch untersucht wurden (cf. Schwarz II und Zopf II, 401).

Etwas ausführlicher will ich dagegen an dieser Stelle noch einige in neuerer Zeit beschriebene *Pilzfarbstoffe* erwähnen:

α) Telephorsäure.

§ 194. Als Telephorsäure bezeichnet Zopf (V, 81) einen aus verschiedenen Telephora-Arten extrahierten Farbstoff, dessen Lösungen schön rotgefärbt sind, während der feste krystallinische Farbstoff eine veilchen- bis indigoblaue Farbe zeigt. Derselbe inkrustiert teils die Membranen, teils ist er denselben in krystallinischer Form aufgelagert.

Charakteristisch ist für die Telephorsäure namentllich das Verhalten gegen *Ammoniak,* das derselben eine prachtvoll blaue Farbe verleiht, während *Kali-* und *Natron*lauge eine mehr blaugrüne Färbung hervorrufen. Die Telephorsäure ist ferner nach Zopf unlöslich in *Wasser, Aether, Chloroform, Petroleumäther, Schwefelkohlenstoff* und *Benzol,* von *Alkohol* wird sie aber in der Wärme ziemlich leicht gelöst. Von konzentrierter *Schwefel-* oder *Salzsäure* wird der feste Farbstoff weder verfärbt, noch gelöst, dagegen lösen denselben konzentrierte *Essigsäure* mit rosenroter oder weinroter, *Salpetersäure* mit gelber, verdünnte *Chromsäure* mit dunkelchromgelber Färbung.

β) Xanthotrametin.

§ 195. Als Xanthotrametin bezeichnet Zopf (V, 86) einen roten Farbstoff, der bei Trametes cinnabarina in Form von kör-

nigen ziegelroten Ueberzügen den Membranen aufgelagert ist. Derselbe wird von konzentrierter *Salpetersäure* mit tief orangeroter, von *Salzsäure* mit orangegelber, dann mehr rötlicher, von *Schwefelsäure* mit rosenroter, von *Eisessig* mit gelber Farbe gelöst. *Verdünnte Schwefelsäure* löst mit zuerst orangegelber, dann mehr ins rötlich gehender Farbe.

In *Ammoniak* und *kohlensaurem Natron* ist das Xanthotrametin mit gelber, in verdünnter *Natronlauge* und *Kalkwasser* mit gelber, dann abblassender, in verdünnter *Kalilauge* mit gelber, schnell ins rötliche übergehender Farbe löslich. In *Eisenchlorid* ist es unlöslich.

γ) Farbstoff von Agaricus armillatus.

§ 196. Derselbe bildet nach Bachmann (II, 7) krystallinische zinnoberrote Splitterchen oder Blättchen, die unlöslich sind in *Alkohol* und *Aether,* aber in wässeriger oder alkoholischer *Kalilauge* sich mit rotvioletter Farbe lösen, die bald in ein dunkles Gelb übergeht.

δ) Farbstoff von Paxillus atrotomentosus.

§ 197. Aus dem obengenannten Pilze wurde von Thörner (I) ein Farbstoff extrahiert, der in krystallinischer Form den Hyphen aufgelagert ist. Diese Krystalle sind übrigens nur an der Oberfläche des Pilzes braun gefärbt, im Inneren höchstens schwach grau oder gelblich. An der Luft nehmen jedoch auch die farblosen krystallinischen Massen allmählich eine braune Färbung an. Nach Thörner stellen diese einen hydrochinonartigen Körper dar, der allmählich in das betreffende Chinon übergeht. Zum Nachweise des Chinons empfiehlt Bachmann (II, 7) stark verdünnte *Kali-* oder *Natronlauge,* die dasselbe augenblicklich mit grünbrauner Farbe lösen.

9. Gerbstoffe.

§ 198. Als *Gerbstoffe, Gerbsäuren* oder *Tannine* bezeichnet man zur Zeit gewöhnlich alle diejenigen Stoffe, die mit Eisensalzen eine blauschwarze oder grüne Färbung annehmen. Es gehören hierher von genauer bekannten Verbindungen namentlich:

Brenzkatechin $C_6H_4(OH)_2$,

Pyrogallusäure $C_6H_3(OH)_3$,

Protokatechusäure $C_6H_3.(OH)_2.COOH$,

Gallussäure $C_6H_2.(OH)_3.COOH$,

Gallusgerbsäure oder *Tannin* $C_{14}H_{10}O_7$ (= Digallussäure?), ausserdem aber noch viele andere Verbindungen, deren Konstitution zur Zeit meist noch nicht mit Sicherheit ermittelt ist (cf. Beilstein III, 431 ff.).

Für eine sichere mikrochemische Unterscheidung dieser Stoffe fehlt es zur Zeit noch gänzlich an zuverlässigen Methoden, obwohl dies um so mehr wünschenswert wäre, da es sich hier sicher um sehr verschiedenartige Substanzen handelt und es, wie neuerdings von Reinitzer (I) hervorgehoben wurde, sehr bedenklich ist, für diese Gruppe von Verbindungen eine einheitliche physiologische Funktion anzunehmen.

Bei der grossen Verbreitung, welche die Gerbstoffe innerhalb des pflanzlichen Organismus besitzen, scheint mir jedoch trotzdem eine ausführliche Besprechung der zum Nachweis der ganzen Gruppe der Gerbstoffe angewandten Methoden geboten. Bei der Untersuchung derselben wurden nun bisher die folgenden Reagentien angewandt:

α) Eisensalze.

§ 199. Von den Eisensalzen benutzte man früher vorwiegend eine wässerige Lösung von *Eisenchlorid;* dieselbe hat aber den Nachteil, dass sie fast immer sauer reagiert und besonders bei eisengrünenden Gerbstoffen im Ueberschuss angewendet die Reaktion sehr schnell wieder aufhebt. Von H. Möller (I, LXIX) wurde deshalb eine Lösung von *wasserfreiem Eisenchlorid* in *wasserfreiem Aether* als Gerbstoffreagenz benutzt. Dieselbe soll namentlich zur Untersuchung grösserer Pflanzenteile, z. B. ganzer Blattstücke, sehr geeignet sein.

Löw und Bokorny (I, 370 Anm.) verwandten neuerdings zum Gerbstoffnachweis in Algen eine konzentrierte wässerige Lösung von *Eisenvitriol,* in der sie die Algen 12—24 Stunden frei an der Luft liegen liessen. In der That erhielt ich in dieser Weise bei Spirogyra und Zygnema eine sehr intensive Reaktion. Dieselbe soll durch Erwärmen auf 60° beschleunigt werden können.

Eine sehr schnelle Reaktion soll schliesslich nach Möller (I, LXIX) auch *Eisenacetat* geben und zwar am besten in der Konzentration der offizinellen tinctura ferri acetici, die ca. 5% Fe oder ca. 20% $Fe(CH_3COO)_3$ enthält.

β) Kupferacetat.

§ 200. Das von Moll (I) in die Mikrochemie eingeführte Kupferacetat hat den Vorteil, dass es mit Gerbstoffen einen unlöslichen Niederschlag bildet; derselbe ist bräunlich gefärbt, nimmt aber bei nachheriger Behandlung mit Eisensalzen, je nachdem wir es mit einem eisengrünenden oder eisenbläuenden Gerbstoffe zu thun haben, eine blaue oder grüne Färbung an. Moll bringt die zu untersuchenden Pflanzenteile in eine konzentrierte wässerige Lösung von Kupferacetat und belässt sie in dieser 8—10 Tage oder beliebig länger. Die aus diesem Material angefertigten Schnitte behandelt er einige Minuten mit einer 0,5% Lösung von Eisenacetat. Nach dem Auswaschen dieses Salzes lassen sich dieselben dann in Glycerin oder Glyceringelatine konservieren.

Will man gleichzeitig eine Fixierung des Zellinhaltes bewirken, so verwendet man nach Klercker (I, 8) an Stelle der wässerigen Kupferacetatlösung eine konzentrierte alkoholische Lösung dieses Salzes [1]), in der man grössere Stücke der zu prüfenden Organe ebenfalls mehrere Tage belässt.

γ) Kaliumbichromat und Chromsäure.

§ 201. Mit *Kaliumbichromat* bilden die meisten Gerbstoffe eine *voluminöse je nach der Menge* des Gerbstoffs hellbraune bis schwarzbraune Fällung, die im Ueberschuss des Salzes sowohl, wie in Wasser unlöslich ist, und nach Möller (I, LXIX) höchst wahrscheinlich aus Purpurogallin besteht.

Man wendet das Kaliumbichromat am zweckmässigsten in der Weise an, dass man grössere Stücke von den zu prüfenden Pflanzenteilen für einen oder mehrere Tage in die konzentrierte wässerige Lösung dieses Salzes bringt und nach dem Auswaschen des Kaliumbichromats Schnitte aus denselben anfertigt. Diese Schnitte zeigen die Fällung im allgemeinen an den Orten, an denen sich vorher der Gerbstoff befand. Sie lassen sich auch unverändert in Glycerin oder Glyceringelatine aufbewahren. Dickere Schnitte oder grössere Pflanzenteile kann man auch zweckmässig in Canadabalsam übertragen. Natürlich ist aber in diesem Falle eine vorherige Entwässerung durch Alkohol und Aufhellung durch Nelkenöl oder dergl. notwendig (cf. § 14—22).

---

1) Diese Lösung ist im Dunkeln aufzubewahren.

Eine Umfärbung der durch Kaliumbichromat bewirkten Fällungen durch *Eisensalze* ist nicht möglich; ebensowenig werden dieselben, wie Overton (II, 5) gezeigt hat, durch *schweflige Säure* verändert; auch *Wasserstoffsuperoxyd* vermag sie nicht anzugreifen.

Um eine schnelle Reaktion zu erhalten, empfiehlt J. af Klercker (1, 8) für manche Fälle, die zu untersuchenden Objekte in eine kochende Kaliumbichromatlösung zu tauchen. In der That erhält man so bei Algen und Schnitten von höheren Gewächsen eine momentane Reaktion.

Nach Möller (I, LXX) soll sich auch durch Zusatz einiger Tropfen Essigsäure die Diffusion des Kaliumbichromats bedeutend beschleunigen lassen.

§ 202. Verdünnte (etwa 1%) *Chromsäure* scheint eine ähnliche Reaktion wie Kaliumbichromat zu geben und lässt sich ebenso wie *Chromosmiumsäure*gemische zum Nachweis der Gerbstoffe verwenden. Dieselben haben den Vorteil, dass sie gleichzeitig eine gute Fixierung des Zellinhaltes bewirken.

Beachtenswert ist jedoch, dass nach Nickel (I, 74) auch verschiedene zu den Gerbstoffen nicht in Beziehung stehende Verbindungen mit Kaliumbichromat ähnliche Fällungen geben.

δ) Osmiumsäure.

§ 203. Osmiumsäure wird durch Gerbsäuren schnell reduziert und erzeugt mit diesen in sehr kurzer Zeit eine bald mehr bläuliche, bald mehr bräunliche Lösung und event. eine schwarze Fällung. Man benutzt zur Reaktion etwa eine 1% Lösung. Durch *Wasserstoffsuperoxyd* wird die Osmiumsäure wieder regeneriert und das Präparat völlig entfärbt.

Setzt man dem Präparat zunächst etwas Salzsäure und dann einige Tropfen 1% Osmiumsäure zu, so entsteht nach Dufour (I, 3 des Sep.) in wenigen Sekunden eine blaue Färbung und, wenn viel Gerbsäure vorhanden ist, alsbald eine blaue Fällung.

Wie Overton (II, 5) gezeigt, werden speziell mit Gerbstoffen durchtränkte Eiweissstoffe gebräunt; so erhielt er eine schöne Braunfärbung der Proteïnkrystalloide, als er entfettete Schnitte durch das Endosperm von Ricinus circa 10 Minuten in verdünnter Tanninlösung beliess und nach sorgfältigem Auswaschen in 2% Osmiumsäurelösung brachte.

ε) Molybdänsaures Ammon.

§ 204. Von Gardiner (III) wurde zum Nachweis der Gerbstoffe eine konzentrierte Lösung von *molybdänsaurem Ammonium* in konzentrierter *Chlorammonium*lösung angewandt. Diese Lösung giebt mit den meisten Gerbstoffen einen gelben, mit Digallussäure einen roten Niederschlag, mit Gallussäure eine in Chlorammonium-Lösung lösliche Verbindung.

ζ) Natriumwolframat.

§ 205. Brämer (I) empfiehlt neuerdings zum Gerbstoffnachweis eine Lösung von 1 gr Natriumwolframat und 2 gr Natriumacetat in 10 ccm Wasser. Dieselbe soll mit Gallussäure eine braune, mit Gallusgerbsäure eine fahlgelbe Fällung geben. Anwesenheit von Wein- und Citronensäure sollen jedoch die Reaktion verhindern.

η) Alkalikarbonate.

§ 206. Alkalikarbonate bewirken in den gerbstoffhaltigen Zellen die Fällung von kugel- oder stäbchenförmigen Körpern, die frisch gefällt durch Auswaschen des Karbonates wieder in Lösung übergeführt werden können, während sie diese Fähigkeit nach einiger Zeit verlieren und allmählich in feste und spröde Körper verwandelt werden. Dieselben Niederschläge treten auch ein, wenn man Tannin und Ammonkarbonat im Reagenzglas zusammenbringt, bei starker Verdünnung der Karbonatlösung allerdings nur dann, wenn man eine allmähliche Speicherung dieses Salzes ermöglicht, was von Klercker (I, 42) in der Weise erreicht wurde, dass er die Tanninlösung in eine einseitig zugeschmolzene Kapillarröhre brachte, und diese dann in ein grösseres mit der betreffenden Karbonatlösung gefülltes Gefäss stellte.

Da ferner die beschriebenen Fällungen nach den Untersuchungen von Klercker bisher nur in gerbstoffhaltigen Zellen beobachtet wurden und auch mit Kaliumbichromat und anderen Reagentien stets die Reaktionen der Gerbstoffe zeigten, so können die Alkalikarbonate sehr wohl als Gerbstoffreagentien benutzt werden.

Allerdings werden durch dieselben nicht alle Gerbstoffe gefällt, so bleibt z. B. Gallussäure ungefällt.

§ 207. Um nun die besprochene Reaktion auszuführen, bringt man entweder Schnitte von dem zu untersuchenden Pflanzenteile auf dem Objektträger in einen Tropfen einer 1—5 % Lösung des Alkalikarbonats oder man kultiviert die Versuchspflanzen einige Zeit in sehr verdünnten, etwa 0,02 % Lösungen. Die *Karbonate* von *Kalium, Natrium* und *Ammonium* scheinen sich in ihrer Wirksamkeit ganz gleich zu verhalten, meist wurde jedoch das Ammoniumsalz zur Reaktion benutzt. Auch *Chlorammonium* soll sich übrigens gleich wie dieses verhalten, während die *Bikarbonate keine* Fällungen bewirken.

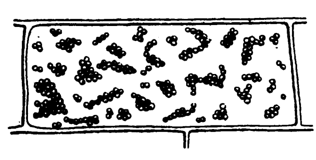


Fig. 30. Zelle aus dem Mark des Blattstieles von Ricinus communis; der betreffende Schnitt hatte zuvor eine Stunde in 1 % Ammonkarbonatlösung gelegen.

Ein sehr geeignetes Untersuchungsobjekt bilden z. B. Stengel und Blattstiele von Ricinus communis, die in Mark und Rinde rot pigmentierte Zellen enthalten. Werden Längsschnitte von denselben in 1 % Ammonkarbonatlösung gebracht, so entstehen nach kurzer Zeit körnige Fällungen, die sich allmählich etwas zusammenballen und nach ca. 1 Stunde fast das ganze Pigment an sich gerissen haben (cf. Fig. 30). Ein sehr geeignetes Untersuchungsobjekt bilden auch gerbstoffhaltige Spirogyrazellen, in denen durch Ammonkarbonat fast momentan eine Fällung hervorgerufen wird.

ϑ) Lebendfärbung mit Methylenblau.

§ 208. Wie von Pfeffer (II, 186) gezeigt wurde, wird von den gerbstoffführenden Zellen Methylenblau gespeichert, und zwar nimmt in Lösungen dieses Farbstoffes zunächst der gerbstoffhaltige Zellsaft eine deutlich blaue Färbung an, erst später treten in den meisten Fällen innerhalb desselben intensiv blau gefärbte Fällungen von verschiedener Gestalt auf, die aus einer Verbindung von Gerbstoff und Methylenblau bestehen und dem Zellsaft schliesslich allen Farbstoff entziehen können.

Diese Reaktion scheint in allen gerbstoffhaltigen Zellen einzutreten und ist namentlich deshalb so wertvoll, weil sie direkt mit lebenden Zellen und ohne Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit derselben ausgeführt werden kann. Man benutzt zu derselben zweckmässig eine Lösung, die auf 500,000 Teile filtrierten Regenwassers 1 Teil Methylenblau enthält und lässt die zu prüfenden

Pflanzenteile 1—24 Stunden in dieser Lösung. Natürlich muss man, um eine erhebliche Speicherung zu ermöglichen, stets grosse Flüssigkeitsmengen anwenden.

Uebrigens wird das Methylenblau auch von anderen Stoffen als Gerbstoffen gespeichert, so nach Waage (I, 253) auch von dem Phloroglucin.

10. Alkaloide.

§ 209. Unter der Bezeichnung Alkaloide fasst man eine grosse Gruppe natürlich vorkommender basischer Verbindungen zusammen, die sämtlich stickstoffhaltig sind und auch bei vielen chemischen Reaktionen eine gewisse Uebereinstimmung zeigen.

So werden dieselben sämtlich durch *Phosphormolybdänsäure*, die man zweckmässig in 10% wässeriger Lösung anwendet, gefällt. Diese Reaktion ist aber deswegen keiner allgemeinen mikrochemischen Anwendung fähig, weil zahlreiche andere Verbindungen durch Phosphormolybdänsäure ebenfalls gefällt werden, so z. B. die *Proteïnstoffe*. Diese kann man nun allerdings nach Errera (V) dadurch von den Alkaloiden unterscheiden, dass man aus einem Teil der zu untersuchenden Schnitte vor der Behandlung mit Phosphormolybdänsäure die Alkaloide auszieht, während man die Proteïnstoffe vollständig ausfällt. Sehr geeignet fand Errera zu diesem Zwecke Alkohol, der auf 20 ccm 1 gr krystallisierte Weinsäure enthält. Er lässt denselben ½—24 Stunden auf die betreffenden Schnitte einwirken, wodurch eine vollständige Lösung der Alkaloide unter gleichzeitiger Fällung der Proteïnstoffe bewirkt wird. Unterbleibt bei den so behandelten Schnitten bei nachherigem Zusatz von Phosphormolybdänsäure die Fällung, während dieselbe bei den unveränderten Schnitten eintritt, so könnte man offenbar auf die Anwesenheit von Alkaloiden in den betreffenden Objekten schliessen, vorausgesetzt, dass dies die einzigen in Weinsäure-Alkohol löslichen Substanzen wären, die durch die Phosphormolybdänsäure gefällt werden. Dies ist nun aber keineswegs der Fall (cf. Molisch I, 15), und es kann somit die obige Reaktion nur unter ganz besonderen Umständen verwertbare Resultate liefern.

Das gleiche gilt übrigens auch von den übrigen sogenannten Alkaloïd-Gruppenreaktionen; um so höher ist der Wert der Spezialreaktionen der verschiedenen Alkaloide anzuschlagen, zu deren Besprechung wir jetzt übergehen wollen.

a) Aconitin $C_{33}H_{43}NO_{12}$.

§ 210. Zum mikrochemischen Nachweis des Aconitins ist nach Errera, Maistriau und Clautriau (I) *Jodjodkaliumlösung* am meisten geeignet, die mit demselben einen rotbraunen Niederschlag bildet. Ausserdem erhielten die genannten Autoren mit *Schwefelsäure,* die mit ½ bis ⅓ Volumen Wasser versetzt war, besonders nach vorheriger Befeuchtung der Präparate mit Rohrzuckerlösung bei Gegenwart von Aconitin eine karminrote Färbung.

b) Atropin $C_{17}H_{23}NO_3$.

§ 211. Zum mikroskopischen Nachweis des Atropins verwandte de Wevre (I) *Jodjodkalium*lösung, die in den atropinhaltigen Zellen einen braunen Niederschlag hervorbringt; nach einiger Zeit traten sogar sternförmige Krystallisationen von metallischem Aussehen auf. Auch *Phosphormolybdänsäure,* die einen gelblichen Niederschlag hervorbringt, erwies sich in manchen Fällen als brauchbar.

c) Berberin $C_{20}H_{17}NO_4 + 4\frac{1}{2}H_2O$.

§ 212. Berberin findet sich nach den übereinstimmenden Angaben von Nägeli und Schwendener (I, 503), O. Herrmann (I, 14) und Rosoll (I, 20) bei Berberis vulgaris in den jugendlichen Zellen als goldgelbe Flüssigkeit im Lumen derselben, während es in älteren Teilen namentlich die Membranen des Xylems inkrustiert.

Zum mikrochemischen Nachweis desselben behandelt O. Herrmann die betreffenden Schnitte zunächst mit Alkohol und setzt dann verdünnte *Salpetersäure* (ein Teil Säure auf circa 50 Teile Wasser) zu. Die goldgelbe Färbung ging dann sofort in braungelb über, und es schieden sich alsbald sternförmige goldgelbe Krystalle ab, während der Zellsaft allmählich ganz farblos wurde. Die gleichen Krystalle von Berberin-Nitrat erhält man übrigens auch, wenn man die Schnitte direkt in die verdünnte Salpeter-

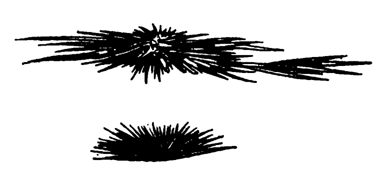


Fig. 31. Krystallgruppen von Berberin-Nitrat, erhalten durch Einlegen von Längsschnitten durch die Rinde von Berberis vulgaris in 2% Salpetersäure-Lösung.

säure bringt; ich benutzte z. B. solche, die 2 Teile der offizinellen Salpetersäure auf 100 Teile Wasser enthielt. Das Berberinnitrat schied sich dann in Form büschelförmig verwachsener Krystalle (cf. Fig. 31) im Inneren der Berberin-haltigen Zellen ab. Diese Krystalle sind stark doppelbrechend und derartig pleochroitisch (§ 356, Anm.), dass sie bei einer bestimmten Stellung des Nikols völlig farblos, und nach einer Drehung um 90° intensiv goldgelb erscheinen.

Ausserdem benutzte Herrmann auch *Schwefelammonium,* zum Nachweis des Berberins, das mit demselben eine bräunliche Färbung giebt.

Von Rosoll wurde ferner *Jodjodkaliumlösung* zu dem gleichen Zwecke angewandt; dieselbe wird den Schnitten nach vorhergehender Behandlung mit Weingeist in geringer Menge zugesetzt. Es bilden sich dann sehr charakteristische haarförmige büschelig angeordnete grüne, oder bei Anwesenheit reicher Jod-Jodkaliummengen gelb- bis rotbraune Krystalle, die durch unterschwefligsaures Natrium wieder gelöst werden. Die so erhaltenen Krystalle lassen sich übrigens in Canadabalsam nach meinen Erfahrungen nicht konservieren.

Wird zu dem gelbgefärbten wässerigen Extrakt der eingetrockneten Rinde *Salzsäure* zugesetzt, so bilden sich nach Nägeli und Schwendener (I, 504) zahlreiche gelbe, häufig strahlenförmig gruppierte Krystallnadeln von salzsaurem Berberin.

d) Brucin $C_{23}H_{26}N_2O_4 + 4H_2O$.

§ 213. Zum Nachweis des neben Strychnin in den Samen von Strychnos nux vomica enthaltenen Brucins verwandte Lindt (II, 239) ein Gemisch von 5 Tropfen *Selensäure* vom spez. Gewicht 1,4 und 1—2 Tropfen Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,2. Dies Reagenz lässt er unter Deckglas zu den durch Petroläther entfetteten zarten Schnitten hinzutreten. Es färben sich dann die geschichteten Zellwandungen rasch hellrot, allmählich werden sie aber orange und gelb, während der Inhalt der Zellen farblos bleibt. Lindt schliesst daraus, dass nur die Membranen Brucin enthalten (cf. übrigens § 219).

e) Colchicin $C_{22}H_{25}NO_6$.

§ 214. Colchicin findet sich nach O. Herrmann (I, 18) innerhalb der Knollen von Colchicum autumnale im Inhalt von

2—3 Zellreihen, die sich in der unmittelbaren Umgebung der Gefässbündel befinden und sich von den umgebenden Parenchymzellen dadurch unterscheiden, dass sie stärkefrei sind. Zum mikrochemischen Nachweis des Colchicins benutzte der genannte Autor *Ammoniak*, das eine intensiv gelbe Färbung desselben bewirkt.

Von Errera, Maistriau und Clautriau (I) wurde das Colchicin neuerdings dadurch charakterisiert, dass es mit *Schwefelsäure*, die mit 2—3 Volumen Wasser verdünnt ist, eine gelbe, mit *Schwefel-* und *Salpetersäure* eine braunviolette Färbung, mit *Jod* eine braune und mit *Jodquecksilberkalium* und *Salzsäure* eine gelbliche Fällung giebt.

f) Corydalin $C_{18}H_{19}NO_4$.

§ 215. Das Corydalin zeigt nach Zopf (VI, 113) folgende Reaktionen: Es wird aus den wässerigen Lösungen seiner Salze durch ätzende und kohlensaure *Alkalien* gefällt, im Ueberschusse der ersteren wieder gelöst; wässerige *Jodlösungen*, sowie *Jodjodkalium* bringen in den Salzlösungen einen braunen, *Jodkalium* einen weissen, *chromsaures Kalium* einen gelben, *Quecksilberchlorid* einen weissen, *Gold-* und *Platinchlorid* einen gelben, *metawolframsaures Natrium* einen gelben, *Quecksilberchlorid* einen weissen, *Kaliumquecksilberchlorid* einen gelblich weissen, *Schwefelcyankalium* einen weissen Niederschlag hervor. Die weingeistige Lösung wird durch *Alkohol* gefällt.

Zum mikrochemischen Nachweis desselben verwandte Zopf namentlich *Ammoniak*, das in den corydalinhaltigen Zellen alsbald eine dunkelgraue körnige Fällung bewirkte, und *Jodjodkalium*, das einen tiefrotbraunen Niederschlag erzeugt. Auch *Pikrinsäure* ruft nach Zopf in den corydalinhaltigen Zellen eine mikroskopisch leicht wahrnehmbare Fällung hervor.

g) Cytisin $C_{20}H_{27}N_3O$.

§ 216. Cytisin findet sich nach Rosoll (I, 24) in allen Organen von Cytisus Laburnum, in grösster Menge aber im Inhalt der Zellen des reifen Samens. Zum mikrochemischen Nachweis desselben benutzt der genannte Autor folgende Reaktionen:

Jodjodkalium giebt selbst bei starker Verdünnung eine bräun-

liche Färbung, dann einen dunkelrotbraunen in Natriumhyposulfit löslichen Niederschlag.

Pikrinsäure, zu dünnen Schnitten hinzugefügt, erzeugt nach kurzer Zeit blättrig-schuppige Krystallgruppen von rotgelber Farbe.

Konzentrierte Schwefelsäure löst das Cytisin hellrötlichgelb, werden dieser Lösung sehr kleine Stückchen von festem *Kaliumbichromat* hinzugefügt, so wird die Lösung erst gelb, dann braun und schliesslich grün.

Phosphormolybdänsäure erzeugt in den Schnitten augenblicklich eine gelbe Trübung.

h) Opiumalkaloide.

§ 217. Nach den Untersuchungen von Clautriau (I) finden sich bei Papaver somniferum mehrere der sogenannten Opiumalkaloide in der lebenden Pflanze innerhalb des Milchsaftes.

1. Morphin $C_{17}H_{19}NO_3$.

Die Gegenwart von Morphin erschliesst der genannte Autor zunächst daraus, dass der betreffende Milchsaft mit *Jodjodkalium, Jodwismuthkalium, Jodcalciumkalium, Jodquecksilberkalium* und *Phosphormolybdänsäure* Fällungen giebt, *Jodsäure* reduziert, sich mit einer 2% Lösung von *Titansäure* in Schwefelsäure rotbraun und mit einer Lösung, die 5 Tropfen *Methylal* ($CH_2(OCH_3)_2$) auf 1 ccm konzentrierte Schwefelsäure enthält, intensiv violett färbt.

2. Narcotin $C_{22}F_{23}NO_7$.

Die Anwesenheit von Narcotin im Milchsafte folgert Clautriau einerseits daraus, dass derselbe sich mit einer Lösung von *selensaurem Natron* in Schwefelsäure rotorange färbt, wie dies auch bei Gemischen von Morphin und Narcotin der Fall ist. Andererseits giebt der Milchsaft mit *Palladiumchlorür* und mit *Iridiumchlorür* einen Niederschlag, während mit Morphin und Codeïn das erstere Reagenz gar keine, das letztere nur eine schwache Fällung erzeugt.

3. Narceïn $C_{23}H_{29}NO_9$.

Auf die Gegenwart von Narceïn im Milchsaft soll nach Clautriau die bei Zusatz der unter Morphin erwähnten Lösung von *Methylal* auftretende Gelbfärbung deuten.

i) Piperin $C_{17}H_{19}NO_3$.

§ 217 a. Das in den Früchten verschiedener Piperaceen nachgewiesene Piperin ist wenig löslich in kochendem *Wasser,* in *Alkohol* leichter löslich als in *Aether,* leicht löslich in *Benzol,* unlöslich in verdünnten *Säuren.*

Zum mikrochemischen Nachweis des Piperins kann zunächst konzentrierte *Schwefelsäure* dienen, durch welche dasselbe mit gelber Farbe, die später in dunkelbraun und nach 20 Stunden in grünbraun übergeht, gelöst wird (Husemann I, 491). Da die gleiche Reaktion aber auch verschiedene andere Substanzen geben, kann nur das Ausbleiben derselben als negativer Beweis von Wichtigkeit sein.

Eine sehr brauchbare mikrochemische Nachweisungsmethode des Piperins verdanken wir Molisch (I, 27). Nach derselben wird zu den auf dem Objektträger befindlichen Schnitten zunächst ein Tropfen Alkohol zugesetzt, der das Piperin auflöst, dann werden dieselben mit einem Deckglase bedeckt und der Alkohol soweit verdunsten gelassen, dass derselbe nur noch etwa den vierten Teil von dem unter dem Deckglase befindlichen Raume ausfüllt, dann wird Wasser zugesetzt, das — vorausgesetzt, dass man mit Schnitten von der Pfefferfrucht operiert — sofort eine starke milchige Trübung bewirkt, die aber in erster Linie auf das gleichzeitig mit dem Piperin in Alkohol gelöste gelbe Harz zurückzuführen ist. Nach einiger Zeit (etwa 1/4 Stunde) beobachtet man aber — besonders reichlich am Rande des Deckglases — charakteristische farblose Krystalle, die namentlich häufig eine annähernd säbelförmige Gestalt besitzen, nicht selten aber auch in der verschiedensten Weise mit einander verwachsen sind, wie Fig. 32 zeigt, die Krystalle, die in der soeben beschriebenen Weise gewonnen waren, darstellt. Alle diese Krystalle zeigen die oben angeführten Reaktionen des Piperins und bestehen unzweifelhaft aus diesem.

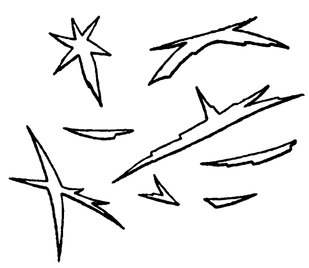


Fig. 32. Piperinkrystalle.

Aehnliche Piperinkrystalle sollen sich nach Molisch (I, 28) innerhalb oder in der Umgebung der Piperinzellen des Pfeffers bilden, wenn man dünne Schnitte unter Deckglas in Wasser oder

Glycerin bringt und dann im feuchten Raume mehrere Stunden aufbewahrt. »Schnitte, welche unter Deckglas im Wasser gedrückt und zerrieben werden, lassen schon innerhalb der ersten $^1/_4$ Stunde die Piperinkrystalle erkennen.«

k) Sinapin $C_{16}H_{23}NO_5$.

§ 218. Findet sich als Rhodansinapin ($C_{16}H_{23}NO_5 . CNSH$) im weissen Senfsamen.

Nach Molisch (I, 31) wird dasselbe am besten mit konzentrierter *Kalilauge* nachgewiesen; die in diese gelegten Schnitte vom weissen Senfsamen färben sich momentan gelb und beim Erwärmen tief orange. Es hat diese Reaktion übrigens nur einen sehr bedingten Werth, da auch das ebenfalls im weissen Senfsamen enthaltene Glycosid *Sinalbin* sich mit Kalilauge gelb färbt.

l) Strychnin $C_{21}H_{22}N_2O_2$.

§ 219. Strychnin wird von konzentrierter *Schwefelsäure* ohne Farbenentwickelung gelöst, wird aber zu dieser Lösung festes *Kaliumbichromat* hinzugefügt, so erscheint sofort eine schön violette Färbung. Von Rosoll (I, 17) wurde diese Reaktion zum mikrochemischen Nachweis des Strychnins benutzt. Er brachte zarte Schnitte aus dem Samen von Strychnos nux vomica zunächst in *konzentrierte Schwefelsäure* und beobachtete, dass der Inhalt der Endospermzellen sich offenbar infolge der Gegenwart von Proteïnstoffen und Zucker (cf. § 227) rosenrot färbte mit Ausnahme der farblos bleibenden Oeltropfen. Wurde nun aber ein kleines Bruchstückchen *Kaliumbichromat* zugefügt, so färbten sich die bisher farblosen Oeltropfen schön violett. Rosoll schliesst hieraus, dass das Strychnin in den Oeltropfen gelöst ist.

Von Lindt (II) wurde zum mikrochemischen Nachweis des Strychnins eine Lösung von überschüssigem *schwefelsauren Ceroxyd* in konzentrierter Schwefelsäure angewandt. Vor dem Zusatz dieses Reagenzes, das sich trotz der allmählichen Rotfärbung des Ceroxyds lange Zeit im gebrauchsfähigen Zustand halten soll, wurden aber die betreffenden Schnitte zur Entfernung von fettem Oel, Traubenzucker und Brucin mit Petroläther und Alkohol extrahiert. Wurde den so behandelten Schnitten dann das schwefelsaure Ceroxyd zugesetzt, so färbten sich sofort sämtliche Zellwandungen stärker oder schwächer violett blau, wäh-

rend der Inhalt der Zellen vorläufig farblos blieb. Nach einiger Zeit wurde jedoch die Reaktion durch verschiedene Nebenumstände gestört. Lindt schliesst aus dieser Beobachtung, dass das Strychnin in den Zellwandungen enthalten ist. Demgegenüber vertritt nun aber Rosoll (I, 18) die Ansicht, dass bei der Extraktion mit Petroläther das zuvor in dem fetten Oele gelöste Strychnin mit ausgezogen wurde und zum Teil in die Membranen diffundierte.

m) Theobromin, Dimethylxanthin

$$CO\left\langle\begin{array}{l} NCH_3 . CH:C . NCH_3 \\ \qquad\qquad\quad | \\ NH\text{———}C:N \end{array}\right\rangle CO.$$

§ 220. Das in den Cacaobohnen enthaltene Alkaloïd, Theobromin, wird nach Molisch (I, 23) am besten mit *Goldchlorid* nachgewiesen und zwar in der Weise, dass zu den auf dem Objektträger befindlichen Schnitten zunächst ein Tropfen konzentrierter Salzsäure und dann nach etwa 1 Minute ein Tropfen ca. 3 % Goldchloridlösung zugesetzt wird. Sobald ein Teil der Flüssigkeit verdampft ist, schiessen dann am Rande des Tropfens lange gelbe Nadeln an, die sich schliesslich zu feder- oder strauchartigen Aggregaten vereinigen. Diese Krystalle bestehen aus der Doppelverbindung: $C_7H_8N_4O_2HCl . AuCl_3$.

n) Methyltheobromin, Kaffeïn, Theein, Trimethylxanthin

$$CO\left\langle\begin{array}{l} NCH_3 . CH : C . NCH_3 \\ \qquad\qquad\quad | \\ NCH_3\text{———}C : N \end{array}\right\rangle CO + H_2O.$$

§ 221. Zum mikrochemischen Nachweis des Kaffeïns empfiehlt Molisch (I, 7) zunächst *Goldchlorid;* dasselbe wird in der gleichen Weise angewandt wie zum Nachweis des Theobromins, und es bilden sich bei der Anwendung desselben ebenfalls büschelförmig ausstrahlende Nadeln (von der Zusammensetzung $C_8H_{10}N_4O_2 . HCl . AuCl_3$), die von denen der entsprechenden Theobrominverbindung nicht mit Sicherheit unterschieden werden können.

Von Hanausek (I) wurde übrigens neuerdings darauf aufmerksam gemacht, dass namentlich dann, wenn die betreffende

Goldchloridlösung mehr als 3% dieses Salzes enthält, ein Tropfen derselben mit konzentrierter Salzsäure beim Verdunsten ebenfalls gelbgefärbte Krystalle bilden soll. Dieselben sollen sich aber von den Kaffeïn-Goldchlorid-Krystallen dadurch unterscheiden, dass sie niemals spitz endende oder büschelig ausstrahlende Nadeln bilden, wie die Kaffeïn-Gold-Verbindung, sondern aus teils sehr kurzen, zickzackartig angeordneten, teils auffallend langen, zarten gelben Stäbchenprismen und aus Tafeln mit rechtwinkligen Vorsprüngen bestehen.

Ausserdem giebt Molisch noch eine weitere Methode des Kaffeïnnachweises an. Nach derselben werden Schnitte auf dem Objektträger in einem Tropfen destillierten Wassers bis zum Aufwallen erwärmt dann bei gewöhnlicher Temperatur eintrocknen gelassen und der Rückstand mit einem Tröpfchen *Benzol* aufgenommen. Beim Verdampfen desselben fällt am Rande des Tropfens das Kaffeïn in Form von zahllosen farblosen Nadeln aus.

o) Veratrin $C_{37}H_{53}NO_{11}$.

§ 222. Veratrin findet sich nach den Untersuchungen von Borscow (I, 58) innerhalb der unterirdischen Teile von Veratrum album namentlich in den Wandungen der Epidermis- und Schutzscheidenzellen. Der genannte Autor benutzte zum mikrochemischen Nachweis des Veratrins ein Gemisch von 1 Teil konzentrierter *Schwefelsäure* und 2 Teilen Wasser, in das er die zu untersuchenden Schnitte direkt hineinbringt. Die Veratrin-haltigen Teile färben sich dann zunächst gelb, darauf rotorange und endlich rotviolett.

11. Stickstoffhaltige Basen.

Nicotin $C_{10}H_{14}N_2$.

§ 223. Von Errera, Maistriau und Clautriau (I) werden zum mikrochemischen Nachweis des Nicotins die folgenden Reaktionen empfohlen: *Phosphorwolframsäure* giebt einen starken erst gelben, dann gelbgrünen, *Quecksilberchlorid* einen weissen, in überschüssigem *Chlorammonium* in der Wärme löslichen Niederschlag, *Jodquecksilberkalium* eine reichliche weisse, *Platinchlorid* eine gelbweisse, bei 70° lösliche, *Jodjodkalium* eine braungelbe, wieder verschwindende Fällung.

12. Die Proteïnstoffe und verwandte Verbindungen.

§ 224. Obwohl die Eiweiss- oder Proteïnstoffe unstreitig zu den wichtigsten Bestandteilen des Plasmakörpers gehören, sind wir doch über die chemische Konstitution derselben noch sehr wenig unterrichtet; jedenfalls haben wir es in denselben aber mit einer Gruppe verschiedenartiger Verbindungen zu thun, und es ist auch in der That bereits von verschiedenen Forschern eine grosse Anzahl verschiedener Proteïnstoffe unterschieden worden. Da jedoch bisher noch keine Einteilung der Proteïnstoffe zur allgemeinen Anerkennung gelangt ist und namentlich eine exakte mikrochemische Unterscheidung der makrochemisch dargestellten Proteïnstoffe zur Zeit noch nicht ausführbar ist, glaube ich, diese Untersuchungen an dieser Stelle um so mehr unberücksichtigt lassen zu können, als sie bisher bezüglich des pflanzlichen Organismus noch nicht zu irgendwelchen morphologisch oder physiologisch interessanten Ergebnissen geführt haben. Dahingegen scheint es mir geboten, die bisher zum mikroskopischen Nachweis der Proteïnstoffe angewandten Methoden kurz zusammenzustellen und dann einige verwandte Stoffe, die bisher mikroskopisch im Plasmakörper nachgewiesen wurden, kurz zu besprechen.

a) Reaktionen der Proteïnstoffe.

α) Jodlösungen.

Mit Jod nehmen die Proteïnstoffe eine je nach der Konzentration der Lösung gelbe bis braune Farbe an, und man hat diese Reaktion vielfach zum Nachweis der Proteïnstoffe benutzt, obwohl viele andere Stoffe die gleiche Reaktion geben. In manchen Fällen kann übrigens auch jetzt noch das Verhalten fraglicher Körper gegen Jod einige Anhaltspunkte liefern; man verwendet dann am zweckmässigsten eine jodreichere Jod-Jodkalium-Lösung als beim Stärkenachweis, da das Jod von den Proteïnstoffen in viel geringerer Menge gespeichert wird als von der Stärke.

β) Salpetersäure.

§ 225. Gewöhnliche konzentrierte Salpetersäure gibt mit Proteïnstoffen eine gelbe Färbung durch Bildung der sogenannten *Xanthoproteïnsäure*; diese Reaktion kann durch gelindes Erwärmen beschleunigt werden. Durch Zusatz von Kalilauge oder Ammoniak

wird die Färbung bedeutend intensiver, da die xanthoproteïnsauren Kali- und Ammonsalze intensiver gefärbt sind als die freie Säure. Uebrigens ist auch diese Reaktion nicht völlig zuverlässig, da nicht nur Tyrosin und verschiedene oxyaromatische Verbindungen, sondern auch gewisse Oele, Harze und Alkaloïde die gleiche Reaktion geben (cf. Nickel I, 17).

γ) Millon's Reagenz.

§ 226. Das sogenannte Millon'sche Reagenz stellt ein Gemisch von *Quecksilberoxyd-* und *Quecksilberoxydulnitrat* und *salpetriger Säure* dar; es wird nach Plugge (I) am besten bereitet durch Auflösen von 1 Gewichtsteil Quecksilber in 2 Gewichtsteilen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,42 und nachheriges Verdünnen mit dem zweifachen Volum Wasser. Nach Nickel (I, 7) kann man dasselbe auch in der Weise darstellen, dass man 1 ccm Quecksilber in 9 ccm konzentrierter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,52 löst und die Lösung mit dem gleichen Volum Wasser versetzt. Das so erhaltene Reagenz zersetzt sich mit der Zeit, kann dann aber nach Krasser (I, 140) durch Zusatz einiger Tropfen Kaliumnitritlösung wieder reaktionsfähig gemacht werden.

Das Millon'sche Reagenz giebt mit Proteïnstoffen eine *ziegelrote* oder mehr *rosenrote* Färbung, dieselbe tritt in der Kälte meist erst nach einiger Zeit ein, bei gelindem Erwärmen erheblich schneller, ohne dass damit eine Lösung der Proteïnstoffe verbunden wäre; so blieben z. B. die Proteïnkrystalloide aus dem Endosperm von Ricinus auch beim Erwärmen bis nahe zum Siedepunkt in ihrer Gestalt unverändert. Die Reaktion ist auch sehr empfindlich; sie hat aber den Nachteil, dass sie mit einer grossen Anzahl von anderen Verbindungen ebenfalls in der gleichen Weise stattfindet, nach Plugge (I) bei allen denen, die eine OH-Gruppe am Benzolkern enthalten.

§ 227. Aehnliche Reaktionen wie das Millon'sche Reagenz geben auch das Hofmann'*sche Reagenz*, das eine Lösung von salpetersaurem Quecksilberoxyd mit Spuren von salpetriger Säure darstellt und das sogenannte Plugge'*sche Reagenz*, das aus salpetersaurem Quecksilberoxydul und Spuren von salpetriger Säure besteht (cf. Nickel, I, 12 u. 13).

δ) Raspail's Reagenz.

§ 227. Das sogenannte Raspail'sche Reagenz besteht aus einer konzentrierten wässerigen Rohrzuckerlösung und konzentrierter Schwefelsäure, die gleichzeitig dem zu prüfenden Objekte zugesetzt werden. Die Proteïnstoffe färben sich mit demselben meist rosenrot oder mehr violett. Diese Reaktion hat jedoch den Nachteil, dass sie auf der einen Seite nicht einmal bei allen Proteïnstoffen gelingt und auf der anderen Seite auch bei verschiedenen anderen Stoffen eintritt. Viele Glycoside und Alkaloide werden schon durch konzentrierte Schwefelsäure allein rot gefärbt (cf. Nickel, 37 ff.).

ε) Kupfersulfat und Kalilauge.

§ 228. Bei der Behandlung mit Kupfersulfat und Kalilauge geben die meisten Proteïnstoffe eine violette Reaktion, die aber weder sehr scharf ist, noch auch im Falle des Gelingens unzweideutig die Anwesenheit von Proteïnstoffen darthut. Die Ausführung dieser Reaktion kann in derselben Weise geschehen wie die auf Rohrzucker (cf. § 121).

Bei Spirogyra wurde diese Reaktion von Löw und Bokorny (I, 194) in der Weise ausgeführt, dass er dieselbe zunächst ½ bis 1 Stunde in 0,2 % Kalilauge brachte, dann nach dem Waschen 1 Stunde in 10% Kupfervitriollösung und endlich — nach abermaligem Waschen auf dem Objektträger — mit 2 % Kalilauge betupfte.

ζ) Alloxan, Mesoxalylharnstoff $CO\langle{}^{NH\,.\,CO}_{NH\,.\,CO}\rangle CO$.

§ 229. Alloxan wurde neuerdings von Krasser (I, 18) als Reagenz auf Proteïnstoffe vorgeschlagen. Dasselbe soll in konzentrierter wässeriger oder alkoholischer Lösung am besten den zuvor ausgetrockneten Schnitten zugesetzt werden; es färbt dann die meisten Proteïnstoffe purpurrot, und zwar soll diese Färbung nach Krasser durch konzentrierte Natronlauge nicht verändert werden. Durch freie Säure soll die Reaktion dagegen verhindert werden. Unter den anderen organischen Stoffen, die Krasser, ohne sie leider in seiner Publikation namhaft zu machen, in der gleichen Weise behandelt hat, trat die beschriebene Reaktion nur bei Tyrosin, Asparagin und Asparaginsäure in der gleichen Weise

ein, und sie soll somit durch die diesen Stoffen gemeinsame Gruppe $CH_2 . CHNH_2 . COOH$ hervorgerufen werden.

Der Wert dieser Reaktion ist jedoch, wie Klebs (IV, 699) gezeigt hat, ein nur sehr geringer; denn einerseits geben auch verschiedene anorganischen Verbindungen wie Alkaliphosphate und Dikarbonate mit Alloxan sehr intensive Rotfärbung, andererseits färbt sich das Alloxan beim Verdunsten an der Luft direkt rot und zwar wird diese Färbung nach Klebs ebensowohl wie die mit Eiweisstoffen bewirkte Rotfärbung durch Natronlauge in violett übergeführt.

η) Aldehyde.

§ 229. Verschiedene Aldehyde, namentlich *Salicylaldehyd* $C_6H_4 . OH . CHO$, *Anisaldehyd* $C_6H_4 . OCH_3 . CHO$, *Vanillin* $C_6H_3 . OH . OCH_3 . CHO$ und *Zimmtaldehyd* $C_6H_5 . CH : CH . CHO$, wurden neuerdings von Reichl und Mikosch (I, 34) zum mikrochemischen Nachweis der Eiweissstoffe empfohlen. Die Reaktion wird in der Weise ausgeführt, dass man die zu prüfenden Objekte zunächst 24 Stunden in einer $^1/_2$—1% alkoholischen Lösung des betreffenden Aldehydes belässt und dann auf dem Objektträger in ein Gemisch von gleichen Volumen Wasser und Schwefelsäure bringt, dem einige Tropfen *Ferrisulfat* ($Fe_2(SO_4)_3$) zugesetzt sind. Die meisten Proteïnstoffe zeigen dann eine bald sofort, bald erst nach einiger Zeit eintretende Färbung, die jedoch nicht nur von der Natur des angewandten Aldehydes abhängig ist, sondern auch bei den verschiedenen Eiweissstoffen sehr verschieden ausfällt und bei manchen auch ganz unterbleibt. Uebrigens schwanken die Farben bei dem Salicylaldehyd, dem Anisaldehyd und dem Vanillin zwischen rot, violett und blau, während der Zimmtaldehyd gelbe oder orangegelbe Farbentöne mit den Proteïnstoffen hervorruft.

Das Salicylaldehyd soll nach den Angaben der genannten Autoren noch den Vorteil haben, dass es in manchen Fällen die Proteïnstoffe vollständiger fixiert und gegen die lösende Kraft der Schwefelsäure resistenzfähiger macht.

ϑ) Gelbes Blutlaugensalz und Eisenchlorid.

§ 230. Von Zacharias (I, 211) wurde neuerdings eine zuerst von Th. Hartig angewandte Nachweisungsmethode für

Proteïnstoffe wieder in die botanische Mikrochemie eingeführt, die, obwohl sie eigentlich mehr eine Tinktion als eine Reaktion darstellt, hier Erwähnung finden mag. Von Zacharias wird diese Reaktion in der Weise ausgeführt, dass die zu prüfenden Pflanzenteile zuerst 1 Stunde lang in einem Gemisch von 1 Teil 10 % wässeriger Lösung von gelbem Blutlaugensalz, 1 Teil Wasser und 1 Teil Essigsäure vom spezifischen Gewicht 1,063 gebracht werden. Dann wird dies Gemisch, das seiner Zersetzlichkeit wegen stets frisch bereitet werden muss, so lange mit 60 % Alkohol ausgewaschen, als die Waschflüssigkeit noch sauer reagiert oder sich mit Eisenchlorid blau färbt. Darauf wird verdünnte Eisenchloridlösung zugesetzt, die in den Eiweissstoffen infolge des von ihnen zurückgehaltenen Blutlaugensalzes eine intensiv blaue Färbung (Berliner Blau) hervorruft.

§ 231. Um im Cytoplasma der Spirogyren Eiweiss nachzuweisen, verfuhren Löw und Bokorny (I, 372) in der Weise, dass sie die betreffenden Algen zuerst 1 Stunde lang in 0,1 % Ammoniaklösung beliessen, dann für 12 Stunden in eine 10 % Blutlaugensalzlösung brachten, der 5 % Essigsäure zugesetzt war, dann mit kaltem Wasser auswuschen und schliesslich 12 Stunden in einer nicht zu verdünnten Eisenchloridlösung verweilen liessen. Es zeigten dann bestimmte Differenzierungen im Cytoplasma deutliche Blaufärbung.

ι) Pepsin und Pankreatin.

§ 232. In neuerer Zeit wurden auch die im Magen und Pankreas ausgeschiedenen Fermente, die bekanntlich die Fähigkeit besitzen, die Proteïnstoffe in lösliche Verbindungen (Peptone) überzuführen, zum mikrochemischen Nachweis der Eiweisstoffe verwandt. Beide Fermente können jetzt in sehr haltbarer Form als Pepsin-Glycerin und Pankreatin-Glycerin von Dr. G. Grübler (Leipzig, Bayersche Str.) bezogen werden.

§ 233. Die Verdauung mit *Pepsin* kann man zweckmässig in der Weise vornehmen, dass man die betreffenden Objekte in einem Gemisch von 1 Teil Pepsin-Glycerin und 3 Teilen Wasser, das mit 0,2 % gew. chemisch reiner Salzsäure angesäuert ist, einige Stunden lang auf einer Temperatur von 40° C. erhält. Durch Kontrollversuche mit Salzsäure allein kann man sich dann noch von der Wirkungsweise dieser Säure überzeugen.

§ 234. Das *Pankreatin-Glycerin* verdünnt man zweckmässig mit dem 3fachen Volum Wasser und verfährt sonst in der gleichen Weise.

Von bedeutendem Einfluss auf die Reaktion ist jedoch die *Vorbehandlung* der betreffenden Objekte; am leichtesten tritt die Lösung jedenfalls stets an direkt von der lebenden Pflanze entnommenen Schnitten ein. Doch ist im allgemeinen wohl Alkohol-Material bei den Verdauungsversuchen vorzuziehen, da dieses auch die direkt in Wasser löslichen Substanzen auf ihre Verdaulichkeit zu prüfen gestattet und überhaupt viel reinere Bilder gibt. Es ist in diesem Falle aber empfehlenswert, den Alkohol stets nur möglichst kurze Zeit (etwa 24 Stunden) einwirken zu lassen, da derselbe bei längerer Dauer der Einwirkung die Verdaulichkeit beeinträchtigen dürfte.

b) Nucleïne.

§ 235. Nucleïne wurden bisher namentlich aus der Hefe, dem Kalbsthymus, dem Eidotter und dem Lachssperma dargestellt. Dieselben unterscheiden sich von den Proteïnstoffen namentlich dadurch, dass sie Phosphor enthalten; im übrigen zeigten die Analysen der Nucleïne verschiedenen Ursprungs beträchtliche Abweichungen von einander. Von Altmann (II) wurden nun neuerdings aus diesen Nucleïnen Körper von einheitlicher Zusammensetzung isoliert, die er als *Nucleïnsäuren* bezeichnet. Dieselben enthalten ca. 9 % Phosphor und sind im reinen Zustande ganz schwefelfrei. Durch Eiweiss werden die Nucleïnsäuren gefällt, und es werden somit von Altmann die von verschiedenen Autoren dargestellten Nucleïnpräparate als Verbindungen der Nucleïnsäuren mit verschiedenen Mengen von Eiweiss aufgefasst.

§ 236. Ausserdem hat neuerdings namentlich Zacharias (I u. II) hauptsächlich im Zellkerne die allgemeine Verbreitung von Nucleïnen auf mikrochemischem Wege nachzuweisen gesucht. Als charakteristische Reaktionen für dieselben wird von dem genannten Autor die Unlöslichkeit in *Pepsinsalzsäure* angeführt (cf. § 233), in der sie ebenso wie in 0,2—0,3 % Salzsäure ein scharf umschriebenes eigentümlich glänzendes Aussehen annehmen. Dahingegen sind die Nucleïne nach Zacharias löslich in 10 % *Kochsalzlösung*, in konzentrierter *Natriumkarbonatlösung*, verdünnter *Kalilauge*, konzentrierter *Salzsäurelösung* und einem Gemisch von 4 Teilen konzentrierter *Salzsäure* und 3 Teilen Wasser. Es muss

jedoch noch durch weitere Untersuchungen entschieden werden, in wieweit zwischen den makrochemisch dargestellten und den durch die genannten Reaktionen nachgewiesenen Nucleïnen Uebereinstimmung besteht.

c) Plastin.

§ 237. Von Reinke (I) wurde aus den Plasmodien von Aethalium septicum eine stickstoffhaltige Verbindung dargestellt, die derselbe als *Plastin* bezeichnet. Diese Verbindung stellt nach Zacharias (I u. II) die Grundsubstanz des Cytoplasmas dar und stimmt in ihrem mikrochemischen Verhalten darin mit dem Nucleïn überein, dass sie von *Pepsin-Salzsäure* nicht angegriffen wird und in konzentrierter *Salzsäure* löslich ist. Das Plastin soll sich aber dadurch von den Nucleïnen unterscheiden, dass es nach der Behandlung mit *Pepsinlösung* in 10 % *Kochsalzlösung* nicht verquillt, in *Alkalien* schwerer löslich ist und auch von einem Gemisch von 4 Teilen reiner konzentrierter *Salzsäure* und 3 Teilen Wasser nicht gelöst wird.

Es bleibt jedoch noch zu untersuchen, ob das Plastin wirklich eine einheitliche Verbindung oder wenigstens eine Gruppe verwandter Verbindungen darstellt. Nach Löw (I) hätten wir das von Reinke makrochemisch dargestellte Plastin einfach als ein nicht völlig gereinigtes Eiweisspräparat aufzufassen. Dieser Autor zeigte auch, dass das von anderen Autoren für eiweissfrei gehaltene Cytoplasma die Proteïnreaktionen giebt, wenn man dasselbe zuvor einige Zeit mit Kalilauge behandelt (cf. § 228 und Löw, II).

d) Cytoplastin, Chloroplastin, Metaxin, Pyrenin, Amphipyrenin, Chromatin, Linin und Paralinin.

§ 238. Nach den Untersuchungen von Schwarz (I) soll sich der Plasmakörper aus 8 verschiedenen Proteïnstoffen aufbauen, die in ihrer Verbreitung auf ganz bestimmte Differenzierungen des Plasmakörpers beschränkt sein sollen und sich, wenn man die Tabelle, in der dieser Autor die Reaktionen derselben zusammengestellt hat, ins Auge fasst, relativ leicht von einander auf mikrochemischem Wege unterscheiden lassen müssten. Berücksichtigt man nun aber die einzelnen ausführlicher beschrie-

benen Beobachtungsergebnisse des genannten Autors, so findet man, dass die meisten der angewandten Reagentien schon bei der geringen Anzahl von untersuchten Objekten sehr verschiedene Resultate ergeben haben und dass die eigenen Beobachtungen des Verf. keineswegs immer den bestimmten Angaben jener Tabelle entsprechen. Es kann denn auch wohl zur Zeit kein Zweifel mehr darüber bestehen, dass die von Fr. Schwarz unterschiedenen Substanzen keine chemisch definierbaren einheitlichen Verbindungen darstellen. Es müssen auch noch weitere Untersuchungen darüber entscheiden, ob die von dem genannten Autor benutzten Reagentien bei der Verfolgung der verschiedenen morphologischen Elemente des Plasmakörpers gute Dienste zu leisten im Stande sein werden. Am wahrscheinlichsten ist dies wohl bei der von Schwarz (I, 116) benutzten »ziemlich konzentrierten« Kupfersulfatlösung, die im Kern allein das Chromatin lösen und alle anderen Bestandteile desselben gut fixieren soll. Auch ein Gemisch von 1 Volum 10 % wässeriger Ferrocyankaliumlösung, 2 Volumen Wasser und 1/2 Volum Eisessig soll nur das Chromatin lösen; es soll dies Reagenz aber deshalb zur Fixierung nicht geeignet sein, weil in demselben nachträglich Quellungserscheinungen auftreten.

§ 239. Da nun übrigens die von Fr. Schwarz eingeführte Nomenklatur auch bereits anderweitig in der Litteratur angewandt wurde, mögen im Folgenden wenigstens die Namen der von diesem Autor unterschiedenen 8 Verbindungen angeführt werden.

Von denselben finden sich zunächst zwei innerhalb der *Chlorophyllkörper:* das *Chloroplastin* und das *Metaxin;* von diesen soll das erstere grüngefärbte Fibrillen innerhalb der Chloroplasten darstellen, zwischen denen sich das in Wasser lösliche Metaxin befinden soll.

Im *Zellkern* sind nach Schwarz 5 Substanzen zu unterscheiden: das *Amphipyrenin,* das die Kernmembran bildet, das *Pyrenin,* die Substanz der Nucleolen, das *Chromatin,* die stark tinktionsfähige Substanz des Kerngerüstes und das *Linin* und *Paralinin,* von denen das erstere ein fibrilläres Gerüst im Kerne bilden soll, während das Paralinin die Maschen dieses Gerüstwerkes ausfüllen soll.

Im *Cytoplasma* findet sich nach Schwarz nur *eine* Proteïnverbindung, die er als *Cytoplastin* bezeichnet.

13. Fermente.

§ 240. Von Wiesner (IV) wurde angegeben, dass *Pepsin, Diastase* und das von ihm beschriebene *Gummiferment* mit *Orcin* und Salzsäure charakteristische Farbenreaktionen geben, die auch mikrochemisch anwendbar sein sollen. Von Reinitzer (II) wurde jedoch nachgewiesen, dass diese Farbenreaktionen auch durch verschiedene Kohlenhydrate hervorgebracht werden und höchst wahrscheinlich darauf beruhen, dass aus diesen durch das angewandte Reagenz *Furfurol* oder verwandte Verbindungen abgespalten werden.

Ausserdem hat neuerdings Guignard zum Teil ebenfalls unter Benutzung von Orcin den Sitz des *Emulsins* und *Myrosins* festzustellen gesucht.

a) Emulsin.

Durch Emulsin wird bekanntlich das z. B. in den bitteren Mandeln enthaltene Glycosid *Amygdalin* in Blausäure, Bittermandelöl und Zucker zerspalten. Dasselbe findet sich nach Guignard (III) in den Blättern von Prunus Laurocerasus ausschliesslich innerhalb einer die Gefässbündel umgebenden parenchymatischen Scheide. Der genannte Autor schliesst dies daraus, dass nur diese Zellen mit Amygdalinlösung Blausäure bilden, während das Schwamm- und Pallisadenparenchym, das umgekehrt mit Emulsinlösung Blausäure entwickelt, offenbar als der Sitz des Amygdalins anzusehen ist.

Der Inhalt der Emulsin-haltigen Zellen färbt sich ferner rot mit Millon's *Reagenz* und violett mit *Kupfersulfat* und *Kalilauge*. Dass diese Reaktionen von dem Emulsin herrühren, wird dadurch einigermassen wahrscheinlich, dass die entsprechenden Zellen von den emulsinfreien Blättern von Cerasus lusitanica diese Farbenreaktionen nicht geben.

b) Myrosin.

§ 241. Zum mikrochemischen Nachweis des in vielen Cruciferen enthaltenen Myrosins empfiehlt Guignard (II) konzentrierte Salzsäure, die auf 1 ccm einen Tropfen einer 10% wässerigen Orcinlösung enthält. Werden die Schnitte in dieser Lösung

auf nahezu 100° C. erhitzt, so soll in den myrosinhaltigen Zellen eine violette Färbung auftreten.

Im Samen des schwarzen Senfs und auch in anderen Teilen verschiedener Cruciferen tritt diese Reaktion in ganz bestimmten eiweissreichen Zellen auf, die, wie Guignard experimentell nachgewiesen hat, allein im Stande sind, das myronsaure Kali (cf. § 156) zu zerspalten.

III. Abteilung.

Untersuchungsmethoden für die Zellmembran und die verschiedenen Einschlüsse und Differenzierungen des Plasmakörpers.

A. Die Zellmembran.

§ 242. Da die pflanzlichen Zellmembranen zu den *imbibitionsfähigen* Körpern gehören und, wie ihr osmotisches Verhalten lehrt, den verschiedenartigsten in Wasser löslichen Stoffen leicht den Durchtritt gestatten, so ist wohl anzunehmen, dass dieselben innerhalb der lebenden Pflanze niemals einfach aus Cellulose und Wasser bestehen. Vielmehr werden dieselben wohl stets je nach ihrem Alter und ihrer Lage innerhalb des pflanzlichen Organismus mit einer bald grösseren, bald geringeren Menge fremdartiger Körper *inkrustiert* sein. Inwieweit nun das verschiedenartige chemische und physikalische Verhalten der pflanzlichen Zellmembranen derartigen *Inkrustationen* organischer oder anorganischer Natur zuzuschreiben ist, lässt sich zur Zeit in den meisten Fällen noch nicht mit Sicherheit ermitteln.

Sichergestellt ist jedoch durch die neueren Untersuchungen, dass die reine *Cellulose* in vielen Membranen oder Membranpartien gegenüber den anderen Bestandteilen derselben an Masse ganz bedeutend zurücktritt, ja es ist sogar sehr wahrscheinlich, dass die Cellulose vielen Membranteilen gänzlich fehlt.

Eine sichere Entscheidung lässt sich in diesen Fragen natürlich nur dann erlangen, wenn durch *makroskopische* Untersuchungen eine sichere Basis für die Unterscheidung der verschiedenen Bestandteile der Zellmembran gewonnen ist. In dieser Hinsicht sind nun aber, wenn auch speziell in den letzten Jahren die makrochemische Untersuchung der Zellmembran von verschiedenen

Seiten in Angriff genommen wurde, unsere Kenntnisse noch zu lückenhaft, um bereits ein einheitliches System der verschiedenen Membranbestandteile zu ermöglichen.

§ 243. So ziehe ich es denn auch vor, im Folgenden zunächst die in erster Linie nach ihrem mikrochemischen Verhalten unterschiedenen Membranarten zu besprechen. Als solche unterscheidet man nun seit langer Zeit ziemlich allgemein, die reine *Cellulosemembran*, die *verholzte Membran*, die *cuticularisierte* oder *verkorkte* Membran, die *verschleimte* Membran und die *Pilzcellulose*. Im Anschluss an die verschleimte Membran sollen gleichzeitig auch die übrigen *Pflanzenschleime* und *Gummiarten* und die *Gallertbildungen* der Konjugaten besprochen werden. An diese verschiedenen Membranmodifikationen reihen sich dann noch die als Reservestoffe funktionierenden *paragalactanartigen* Substanzen, die *Callose* und die *Pektinstoffe* an. Schliesslich sollen in diesem Kapitel die Darstellung der *Aschen*- und *Kieselskelette* und einige Methoden, welche bei der Untersuchung der Entwickelungsgeschichte und der feineren Struktur der Zellmembranen angewandt wurden, besprochen werden.

1. Die Cellulosemembran.

§ 244. Die Cellulose ist bekanntlich ein Kohlehydrat, dessen empirische Zusammensetzung der Formel $C_6H_{10}O_5$ entspricht. Charakterisiert ist dieselbe namentlich durch die Löslichkeit in *Kupferoxydammoniak* und konzentrierter *Schwefelsäure*, die Blau- resp. Violettfärbung mit *Jod und Schwefelsäure* oder *Chlorzinkjod* und dadurch, dass sie bei der hydrolytischen Spaltung mit Schwefelsäure schliesslich in einen gährfähigen Zucker (Glykose) übergeht.

§ 245. Zu bemerken ist jedoch, dass es höchst wahrscheinlich verschiedene Substanzen von der gleichen Reaktion giebt, die vielleicht nahe verwandte isomere Verbindungen darstellen. So zeigt die Cellulose nach W. Hoffmeister (I und II) namentlich gegen 1—5% *Natronlauge* ein sehr verschiedenartiges Verhalten, insofern sie in dieser teils löslich, teils unlöslich ist. Eine genaue mikrochemische Unterscheidung verschiedener Cellulosearten ist jedoch zur Zeit noch nicht möglich gewesen, und man wird also wohl zur Zeit am zweckmässigsten alle diejenigen Membranen oder Membranteile, die die obigen Reaktionen zeigen,

als *reine Cellulosemembranen* bezeichnen, wobei natürlich die Aschenbestandteile etc. ganz unberücksichtigt bleiben.

§ 246. Zum *mikrochemischen Nachweis* der Cellulosemembranen benutzt man zweckmässig folgende Reaktionen:

1. Die *Löslichkeit in konzentrierter Schwefelsäure.* Dieselbe beginnt mit einer starken Aufquellung, die bei Zusatz der konzentrierten Säure alsbald in Lösung übergeht.

2. Die Löslichkeit in *Kupferoxydammoniak.* Dies Reagenz, das auch den Namen Schweizer'*sches Reagenz* führt, kann in der Weise bereitet werden, dass man aus einer Kupfervitriollösung mit verdünnter Natronlauge Kupferoxydhydrat fällt, dies mit Wasser durch wiederholtes Dekantieren auswäscht, dann filtriert und in *möglichst konzentrierter* Ammoniakflüssigkeit löst.

Ein ebenfalls sehr geeignetes Reagenz erhält man übrigens in einfacherer Weise dadurch, dass man Kupferdrehspäne mit 13—16% Ammoniakwasser übergiesst und in offener Flasche stehen lässt (cf. Behrens II, 55).

Das Kupferoxydammoniak besitzt nur eine begrenzte Haltbarkeit. Um dasselbe auf seine Brauchbarkeit zu prüfen, verwendet man zweckmässig Baumwolle, die es sofort vollständig auflösen muss.

3. *Die Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure.* Diese Reaktion wird nach Russow am besten in der Weise ausgeführt, dass man die betreffenden Schnitte zunächst mit einer wässerigen Lösung von 1/8% Jod und 1 1/8% Jodkalium behandelt und dann ein Gemisch von 2 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und 1 Teil Wasser zusetzt.

4. Die *violette Färbung* mit *Chlorzinkjod.* Dies Reagenz wurde gewöhnlich bereitet durch Auflösen von überschüssigem Zink in reiner Salzsäure und Eindampfen zur Schwefelsäurekonsistenz unter stetiger Anwesenheit eines Ueberschusses von metallischem Zink; diese Lösung wird dann mit Jodkalium gesättigt und schliesslich soviel Jod zugesetzt, als sich löst. Einfacher kann man das Chlorzinkjod aber in der Weise herstellen, dass man 25 Teile Chlorzink und 8 Teile Jodkalium in 8,5 Teilen Wasser löst und dann soviel Jod zusetzt, als sich löst (Behrens II, 54). Diese Lösungen halten sich, namentlich wenn sie im Dunkeln aufbewahrt werden, lange Zeit unverändert. Die Reaktion gelingt am besten, wenn die betreffenden Schnitte direkt in das konzentrierte Reagenz eingetragen werden.

5. In neuerer Zeit wurde von Mangin (VII) eine Anzahl weiterer *jodhaltiger Reagentien* empfohlen, die ähnlich wie Chlorzinkjod wirken und zum Teil noch empfindlicher wie dieses sein sollen.

Ich habe von diesen Reagentien namentlich eine *Chlorcalcium-Jod-Lösung* mit gutem Erfolg angewandt, und zwar habe ich dieselbe an Stelle des etwas umständlicheren Mangin'schen Verfahrens in der Weise dargestellt, dass ich zu 10 ccm einer konzentrierten Chlorcalciumlösung ca. 0,5 gr Jodkalium und 0,1 gr Jod zusetzte und die Lösung nach schwachem Erwärmen von dem überschüssigen Jod durch Filtration mittelst Glaswolle trennte. Diese Lösung, in welche die Schnitte ebenfalls am besten direkt hineingebracht werden, färbt die verholzten Membranen gelb bis gelbbraun, die reinen Cellulosemembranen aber zunächst rosenrot, nach einiger Zeit schön violett; sie ist nach Mangin im Dunkeln aufzubewahren.

Auch mit Hilfe der von Mangin empfohlenen *Jodphosphorsäure* erhält man eine sehr intensive violette Färbung der reinen Cellulosemembranen, während die verholzten und verkorkten Membranen sich gelb bis braun färben. Man bereitet dieses Reagenz, indem man in möglichst konzentrierte wässerige Phosphorsäurelösung eine geringe Menge Jodkalium (etwa 0,5 gr auf 25 ccm) und einige Jodkrystalle einträgt und schwach erwärmt. Die Schnitte werden, bevor sie in diese Lösung eingetragen werden, zweckmässig mit Fliesspapier von allem äusserlich anhaftenden Wasser befreit.

Ausserdem empfiehlt Mangin noch Gemische von Aluminiumchlorür oder Zinnchlorid mit Jod und Jodkalium. Bezüglich der Darstellungs- und Wirkungsweise dieser Lösungen sei auf die Mangin'sche Arbeit verwiesen.

§ 247. Ausserdem kann nun übrigens auch das *Verhalten gegen Tinktionsmittel* zum Nachweis der reinen Cellulosemembranen benutzt werden. Diese können aber natürlich auch dazu dienen bei zarten Schnitten, Mikrotomschnitten oder dergl., das Membrannetz besser hervortreten zu lassen.

Sehr geeignet ist zu diesem Zwecke das *Haematoxylin,* von dem zuerst Giltay (I) nachgewiesen, dass es ausschliesslich die unverholzten und unverkorkten Membranen intensiv tingiert. Man kann dasselbe in sehr verschiedenen Lösungen anwenden (z. B. in der sogenannten Böhmer'schen cf. § 315 oder in der Dela-

field'schen cf. § 314); durch diese werden die reinen Cellulosemembranen intensiv violett gefärbt, während die verholzten und verkorkten zunächst ungefärbt bleiben oder gelb bis braun tingiert werden. Bei den meisten Schnitten genügt eine Einwirkung von wenigen Minuten, um eine intensive Färbung der Membranen zu bewirken.

§ 248. Vom Verf. wurde das Haematoxylin auch mit bestem Erfolg zum Nachweis der *Hoftüpfelschliesshäute* verwandt. Beim Koniferenholz genügt es, die betreffenden Schnitte 15 Minuten in Böhmer'scher Haematoxylin-Lösung (cf. § 315) zu belassen, um eine intensive Tinktion der Tori der Hoftüpfel zu erhalten, die natürlich nach dem Aufhellen in Canada-Balsam (cf. § 14—22) am besten hervortreten (Zimmermann, IV).

§ 249. Ausserdem können zur Färbung der Cellulosemembranen auch *Anilinblau* und *Methylblau* benutzt werden. Diese bewirken an Mikrotomschnitten in einer Stunde stets eine intensive Färbung, die auch durch Alkohol, Nelkenöl oder Xylol nicht angegriffen wird, so dass eine Uebertragung derartiger Präparate in Canadabalsam möglich ist. In ähnlicher Weise wirkt auch eine Lösung von *Berliner Blau*, die man sich in der Weise bereitet, dass man 1 gr lösliches Berliner Blau und 0,25 gr Oxalsäure mit wenig destilliertem Wasser einige Stunden stehen lässt, dann 100 gr Wasser zusetzt und filtriert (cf. Strasburger I, 622). Um eine einigermassen intensive Färbung zu erhalten, muss man diese Lösung meist mehrere Stunden einwirken lassen. Sie wird ebenfalls durch Alkohol nicht ausgewaschen.

§ 250. Eine sehr intensive und dauerhafte Membranfärbung erhält man auch nach Van Tieghem und Douliot (I), wenn man Schnitte, die zuvor durch Eau de Javelle und Kalilauge von allen Inhaltsstoffen der Zellen befreit waren, nach dem gründlichen Auswaschen zunächst auf 1—2 Minuten in eine verdünnte *Tannin*lösung und dann möglichst rasch in eine sehr verdünnte *Eisenchlorid*lösung taucht. Aus dieser werden sie sofort wieder herausgenommen und dann in Glyceringelatine oder Canadabalsam eingeschlossen. Sämtliche Membranen sind dann intensiv schwarz gefärbt.

Zur Färbung jugendlicher Membranen von *Mikrotomschnitten* fand ich neuerdings auch *Congorot* sehr geeignet, das ich in konzentrierter wässeriger Lösung 24 Stunden lang auf die Mikrotom-

schnitte einwirken liess, dann wurden sie mit Alkohol abgespült und in Canadabalsam eingeschlossen.

2. Die verholzten Membranen.

§ 251. Die verholzten Membranen unterscheiden sich von den reinen Cellulosemembranen zunächst dadurch, dass sie in *Kupferoxydammoniak* unlöslich sind und sich sowohl mit *Jod* und *Schwefelsäure* als auch mit *Chlorzinkjod* gelb oder braun färben. Nach der früher allgemein verbreiteten Annahme sollte nun dies abweichende Verhalten der verholzten Membranen auf einer Inkrustierung der Cellulose mit einer kohlenstoffreicheren Substanz, dem *Lignin*, beruhen. In der That geben die verholzten Membranen nach einer Behandlung mit dem Schulze'schen Mazerationsgemisch (cf. § 9) die Reaktionen der reinen Cellulose. Nach Mangin (VII) soll das Gleiche auch bei vorheriger Behandlung mit Eau de Javelle eintreten.

§ 252. Neuerdings wurde nun aber von verschiedenen Seiten der Versuch gemacht, über die chemische Zusammensetzung der verholzten Membranen und namentlich auch über die chemische Konstitution des Lignins näheren Aufschluss zu erlangen.

Völlig zuverlässige Resultate lassen sich in dieser Frage natürlich nur durch makrochemische mit genauen quantitativen Analysen durchgeführte Untersuchungen erlangen. In dieser Hinsicht sind nun die neueren Untersuchungen von Lange (I und II) zu erwähnen, der aus dem Holz von Buche, Eiche und Tanne zwei Verbindungen von saurem Charakter, »*Ligninsäuren*«, isoliert hat, die aber möglicherweise von einer einzigen Substanz abstammen. Ausserdem erhielt Lange noch verschiedenartige Nebenprodukte, über deren Bedeutung sich zur Zeit noch nichts angeben lässt.

§ 253. Sehr verbreitet ist ferner in den verholzten Membranen eine gummiartige Substanz, die von Thomsen als *Holzgummi* bezeichnet wurde. Derselbe kann durch 5% Natronlauge aus den betreffenden Membranen extrahiert und aus dieser Lösung durch 90% Alkohol wieder gefällt werden. Bei der Hydrolyse liefert der Holzgummi entweder Arabinose $C_6H_{12}O_6$ oder Xylose $C_5H_{10}O_5$.

Sowohl der Holzgummi als auch die beiden genannten Derivate desselben nehmen beim Erwärmen mit Phloroglucin und Salzsäure eine kirschrote Färbung an. Von Allen (I, 39) wurde jedoch gezeigt, dass die sogleich zu besprechende Phloroglucin-

----PFLANZENFARBSTOFFE----

(Nach Dr. Kylin)

	Hohere Pflanzen	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Diatomeen	Floridae	Cyanophyceae
CHLOROPHYLL A (Euchlorophyll)	x	x	x	x	x	x
CHLOROPHYLL B (Allochlorophyll)	x	x	x (Spuren)		x (Spuren)	
CAROTIN	x	x	x	x	x	x
XANTHOPHYLL	x	x	x	x(?)	x	x(?)
PHYKOXANTHIN (Fukoxanthin)	-	-	x	x(?)	-(?)	-(?)
PHYKOERYTHRIN	-	-	-	-	x	($\bar{x}$)
PHYKOCYAN	-	-	-	-	($\bar{x}$)	x

(2 boxes)

---- [illegible] ----

([illegible] Dr. Kylin)

	Höhere Pflanzen	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Diatomeen	Florideae	Cyanophyceae
CHLOROPHYLL A (Neochlorophyll)	x	x	x	x	x	x
CHLOROPHYLL B (Allochlorophyll) =	x	x	x(Spuren)		x(Spuren)	
CAROTIN	x	x	x	x	x	x, =
XANTHOPHYLL	x	x	x	x(?)	x	x(?)
PHYCOXANTHIN (Fucoxanthin) =	-	-	x	x(?)	-(?)	-(?)
PHYCOERYTHRIN	-	-	-	-	x	(x) =
PHYCOCYAN	-	-	-	-	(x)	x

(Nach Dr. Kylin)

	Höhere Pflanzen	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Diatomeen	Florideae	Cyanophyceae
CHLOROPHYLL A (Neochlorophyll)	x	x	x	x	x	
CHLOROPHYLL B (Allochlorophyll)	x	x	x(Spuren)		x(Spuren)	x
CAROTIN	x	x	x	x	x	x
XANTHOPHYLL	x	x	x	x(?)	x	x(?)
PHYCOXANTHIN (Fukoxanthin)	-	-	x	x(?)	-(?)	-(?)
PHYKOERYTHRIN	-	-	-	-	x	($\bar{x}$)
PHYKOCYAN	-	-	-	-	($\bar{x}$)	x

----PFLANZENFARBSTOFFE----

(Nach Dr. Kylin)

	Hohere Pflanzen	Chloro-phyceae	Phaeo-phyceae	Diatomeen	Floridae	Cyano-phyceae
CHLOROPHYLL A (Neochlorophyll)	x	x	x	x	x	x
CHLOROPHYLL B (Allochlorophyll)	x	x	x(Spuren)		x(Spuren)	
CAROTIN	x	x	x	x	x	x
XANTHOPHYLL	x	x	x	x(?)	x	x(?)
PHYKOXANTHIN (Fukoxanthin)	-	-	x	x(?)	-(?)	-(?)
PHYKOERYTHRIN	-	-	-	-	x	(x̄)
PHYKOCYAN	-	-	-	-	(x̄)	x

(Nach [illegible] Kylin)

	Höhere Pflanzen	Chloro-phyceae	Phaeo-phyceae	Diatomeen	Florideae	Cyano-phyceae
CHLOROPHYLL A ([illegible]chlorophyll)	x	x	x	x	x	x
CHLOROPHYLL B ([illegible]chlorophyll)	x	x	(Spuren)		x(Spuren)	
CAROTIN	x	x	x	x	x	x
XANTHOPHYLL	x	x	x	x(?)	x	x(?)
[illegible] ([illegible])	–	–	x	x(?)	–(?)	–(?)
PHYCOERYTHRIN	–	–	–	–	x	(x)
PHYCOCYAN	–	–	–	–	(x)	x

----PFLANZENFARBSTOFFE----

(Nach Dr. Kylin)

	Hohere Pflanzen	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Diatomeen	Floridae	Cyanophyceae
CHLOROPHYLL A (Neochlorophyll)	x	x	x }	x	x }	x
CHLOROPHYLL B (Allochlorophyll)	x	x	x(Spuren) }		x(Spuren) }	
CAROTIN	x	x	x	x	x	x
XANTHOPHYLL	x	x	x	x(?)	x	x(?)
HYKOXANTHIN (Fukoxanthin)	-	-	x	x(?)	-(?)	-(?)
HYKOERYTHRIN	-	-	-	-	x	(x̄)
HYKOCYAN	-	-	-	-	(x̄)	X

eaktion der verholzten Zellmembranen nicht auf den Holzgummi urückzuführen ist; denn einerseits tritt die Reaktion bei den verıolzten Zellmembranen auch in der Kälte ein, und andererseits ;eigen die bei den verschiedenen Reaktionen auftretenden Farben ;in sehr verschiedenes spektroskopisches Verhalten.

§ 254. Ausserdem hat man nun aber auch durch *mikrochemische* Untersuchungen die chemische Konstitution der verholzten Membranen zu ermitteln versucht, und es hat namentlich Singer (I) und neuerdings Hegler (I) den Nachweis zu liefern gesucht, dass sich *Coniferin* und *Vanillin* in den verholzten Membranen stets vorfänden. Diese Ansicht stützt sich namentlich auf eine Reihe von Farbenreaktionen, welche die verholzten Membranen mit verschiedenen aromatischen Verbindungen zeigen. Ich gebe im folgenden zunächst eine Zusammenstellung der wichtigsten dieser Reaktionen mit kurzen Bemerkungen über die Anwendungsweise derselben, die schon deshalb an dieser Stelle Erwähnung finden muss, da diese Reaktionen auch mit gutem Erfolg zum mikrochemischen Nachweis der Verholzung dienen können, s. pag. 142.

§ 255. Nach Hegler (I, 40) geben nun alle daraufhin näher geprüften Verbindungen auch mit dem *Coniferin* oder *Vanillin* oder mit Gemischen von beiden Stoffen die gleichen Farbenreaktionen und es hält es dieser Autor somit für erwiesen, dass sich diese beiden Verbindungen konstant innerhalb der verholzten Membranen vorfinden und dass sie die Ursache der oben beschriebenen Farbenreaktionen derselben sind.

Eine besondere Beachtung verdienen von den oben aufgezählten Reagentien noch das *Thallin* und das *Phenol,* insofern nach Hegler (I) das erstere nur mit Vanillin, das letztere nur mit Coniferin die beschriebene Farbenreaktion zeigen soll [1]). Da nun das Thallin das Vanillin gelb, das Phenol aber das Coniferin blau färbt, so kann man offenbar bei Anwendung eines Gemisches von beiden Reagentien, je nachdem der bei der Reaktion eintretende Farbenton ein mehr gelber oder blauer ist, auf das Mengenverhältnis dieser beiden Substanzen gewisse Schlüsse ziehen. Von Hegler (I, 58) wurde zu dem gleichen Zwecke eine Lösung verwandt, die durch Vermischen von 0,5 gr Thallinsulfat, 1,3 gr

---

1) Die Richtigkeit der Angabe Hegler's, dass auch das *Thymol* mit Vanillin keine Färbung geben sollte, wird neuerdings von Molisch (I, 48 Anmerkung 3) bestritten.

Tabelle zu § 254 (Farben-Reaktionen der verholzten Zellmembranen).

Reagenz	Chemische Formel	Art der Anwendung	Färbung der verholzten Membranen	Litteratur
Phenol	C_6H_5OH	Die konzentrierte H_2O-Lösung wird mit soviel ClO_3K versetzt, als sich darin auflöst. Diese Lösung gleichzeitig mit HCl zugesetzt.	blau oder grünblau	v. Höhnel, II. Singer, I. Molisch, III, 304.
Thymol	$C_6H_3 \begin{cases} CH_3 \\ C_3H_7 \\ OH \end{cases}$	Die 20 % alkoholische Lösung von Thymol wird so lange mit Wasser verdünnt, als kein Thymol ausfällt, dann festes ClO_3K im Ueberschuss zugesetzt und nach mehreren Stunden filtriert. Diese Lösung gleichzeitig mit HCl zugesetzt	blau oder blaugrün	Molisch, III, 303.
Resorcin	$C_6H_4(OH)_2$	Alkoholische Lösung + HCl	blauviolett	Wiesner, III, 65. Ihl, II.
Orcin	$C_6H_3 \begin{cases} CH_3 \\ (OH)_2 \end{cases}$	Alkoholische Lösung + HCl	dunkelrot	Ihl, II.
Phloroglucin . .	$C_6H_3(OH)_3$	Wässerige oder alkoholische Lösung gleichzeitig mit HCl zugesetzt	rotviolett	Wiesner, III.
α-Naphtol . . .	$C_{10}H_7OH$	15% alkoholische Lösung gleichzeitig mit konzentrierter HCl zugesetzt	blaugrün	Molisch, III, 305.

Anilinsulfat . . .	$(C_6H_5NH_2)_2 . H_2SO_4$	Konzentrierte H_2O-Lösung gleichzeitig mit H_2SO_4 zugesetzt.	goldgelb	Wiesner, III.
Salzsaures Anilin .	$C_6H_5NH_2 . HCl$	In wässeriger oder alkoholischer Lösung gleichzeitig mit HCl zugesetzt.	goldgelb	v. Höhnel, I, 527.
Tholuidendiamin .	$C_6H_3 \langle {CH_3 \atop (NH_2)_2}$	Konzentrierte H_2O-Lösung + HCl	dunkelorange	Hegler, I, 33.
Indol	$C_6H_4 \langle {CH = \atop NH -} \rangle CH$	H_2O-Lösung + Gemisch von 1 Volum konzentrierter H_2SO_4 + 4 Volum H_2O	kirschrot	Niggl, I.
Skatol	$C_6H_4 \langle {CCH_3 \atop NH} \rangle CH$	Konzentrierte alkoholische Lösung mit etwas HCl versetzt	violett	Mattirolo, I.
Thallinsulfat . .	$(C_9NH_{10} . OCH_3)_2 . H_2SO_4$	Konzentrierte Lösung in einem Gemisch von 1 Volum H_2O und 1 Volum Alkohol. Schnitte vorher in Alkohol. Lösung am besten frisch bereitet.	gelb bis dunkelorangegelb	Hegler, I, 33.
Carbazol . . .	${C_6H_4 \atop C_6H_4} \rangle NH$	Erst einige Minuten in die erwärmte konzentrierte alkoholische Lösung, dann in einen Tropfen HCl oder ein Gemisch von 1 Volum H_2SO_4 und 1 Vol. H_2O	rotviolett	Mattirolo, I. Nickel, I, 59.

Thymol, 2 cc Wasser, 26,5 cc Alkohol und 0,5 gr Kaliumchlorat dargestellt und zum Gebrauch mit dem gleichen Volum Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,124 versetzt war. Der genannte Autor zieht aus den mit diesem Reagenz ausgeführten Untersuchungen den Schluss, dass die jüngeren Xylemzellen mehr Coniferin als Vanillin enthalten, die älteren aber reich an Vanillin und weniger reich an Coniferin sind.

§ 256. Auf der anderen Seite ist nun aber zu berücksichtigen, dass ausser dem Vanillin und dem Coniferin auch andere die Aldehydgruppe enthaltende Substanzen mit den genannten Verbindungen identische oder ähnliche Farbenreaktionen geben, wie die verholzten Zellmembranen, so nach Ihl (I) der Zimmtaldehyd und nach Nickel der Salicylaldehyd. Es kann somit zur Zeit wohl nur soviel als unzweifelhaft erwiesen gelten, dass die Farbenreaktionen der verholzten Membranen auf der Gegenwart von einer oder verschiedenen zu der Aldehydgruppe gehörigen Verbindungen beruhen. Hierfür sprechen übrigens auch die von Seliwanoff gemachten Beobachtungen, nach denen die verholzten Membranen einerseits durch eine mit schwefliger Säure entfärbte Fuchsinlösung rot gefärbt werden und andererseits nach der Behandlung mit Hydroxylamin, das sich mit Aldehyden unter Zerstörung der Aldehydgruppe chemisch vereinigt, mit Phloroglucin etc. nicht mehr die Reaktionen der verholzten Zellmembranen geben (cf. Nickel II, 755).

In welchem Verhältnis nun übrigens diese aldehydartigen Verbindungen zu dem sogenannten *Lignin* stehen, lässt sich zur Zeit noch nicht angeben.

§ 257. Zum *mikrochemischen Nachweis* der Verholzung können nun neben dem bereits erwähnten Verhalten gegen *Kupferoxydammoniak* und *Jodlösungen* (cf. § 251) namentlich die in der Tabelle auf pag. 142 u. 143 zusammengestellten Farbenreaktionen dienen. Unter denselben sind namentlich das *Anilinsulfat* und *Phloroglucin* sehr geeignet. Die mit diesen Substanzen erzeugten Färbungen halten sich aber nur kurze Zeit, während das *Thallin* dauerhafte Färbungen giebt und somit auch sehr wohl zur Darstellung von Dauerpräparaten, die man zweckmässig in Glyceringelatine oder Canadabalsam einschliesst, geeignet ist.

§ 258. Ausserdem können nun aber auch verschiedene *Farbstoffe* bei der Untersuchung der verholzten Membranen gute Dienste leisten. Diese verhalten sich nämlich gegen Tinktionsmittel ganz

anders als die unverholzten Membranen und man kann somit verschiedene Farbstofflösungen auch sehr gut zur Unterscheidung der verschiedenen Membranarten benutzen. Sodann wird man diese Färbungen aber auch namentlich für Demonstrationspräparate vielfach mit bestem Erfolg anwenden können.

§ 259. Zur Färbung der verholzten Membranen eignet sich namentlich *Fuchsin,* das bereits von Van Tieghem und Berthold zu diesem Zwecke empfohlen wurde; ich erhielt sehr elegante Dauerpräparate, in denen nur die verholzten Membranen intensiv rot gefärbt waren, wenn ich die betreffenden Mikrotomschnitte zunächst für 1/4 Stunde oder beliebig länger in eine wässerige Lösung dieses Farbstoffes brachte, dann kurze Zeit mit Pikrinsäurelösung (etwa der Altmann'schen, die ein Teil konzentrierte alkoholische Pikrinsäurelösung auf 2 Teile Wasser enthält, cf. § 345) bespülte, wobei sich die Schnitte dunkel färben, darauf mit Alkohol stark auswusch und schliesslich in Xylol oder Xylol-Canadabalsam übertrug.

Will man eine *Doppelfärbung* erhalten, so kann man dies in der Weise ausführen, dass man die betreffenden Präparate nach dem Auswaschen in Alkohol für eine Stunde in eine beliebige *Haematoxylin*lösung (z. B. die sogenannte Böhmer'sche, cf. § 315), *Anilinblau, Methylblau* oder *Berlinerblau* überträgt; man erhält dann nach abermaligem Auswaschen mit Alkohol und Einschluss in Canada-Balsam Präparate, in denen die verholzten Membranen intensiv rot, die reinen Cellulosemembranen aber violett resp. blau gefärbt sind.

§ 260. Aehnliche Präparate lieferte mir *Säurefuchsin* [1]), das entweder mit fliessendem Wasser oder mit der Altmann'schen Pikrinlösung ausgewaschen wurde (cf. § 345 u. 346). Auch Anilinwasser-*Saffranin,* das nach mindestens einstündiger Einwirkung mit Säurealkohol ausgewaschen wurde (cf. § 268), lieferte mir Präparate, in denen nur die verholzten und verkorkten Membranen gefärbt waren. Ebenso verhielt sich endlich *Gentianaviolett*, bei Anwendung der sogenannten Gram'schen Methode (cf. § 321). Alle diese Präparate lassen sich in Canadabalsam gut konservieren und auch in der oben angegebenen Weise zu *Doppelfärbungen* verwenden.

---

1) Dieser Farbstoff wird auch wohl als Fuchsin S, von Dr. Grübler als Fuchsin S nach Weigert bezeichnet.



§ 261. Die genannten Tinktionsmethoden lassen sich auch sehr gut dazu verwenden, um den *Gefässbündelverlauf* in ganzen Pflanzenteilen, wie z. B. Blättern oder dünnen Stengeln, zu demonstrieren. Ich erhielt namentlich sehr instruktive Bilder mit konzentrierter wässeriger Fuchsinlösung, unter der ich die betreffenden Pflanzenteile abschnitt, so dass die Gefässbündel meist schon nach relativ kurzer Zeit intensiv rot gefärbt waren. War dies geschehen, brachte ich entsprechende Stücke von den betreffenden Objekten in Alkohol, bis das Chlorophyll vollständig entfernt war, hellte in Nelkenöl auf und übertrug in Canadabalsam. Sehr geeignete Versuchsobjekte bilden z. B. die Blätter von Secale cereale und Impatiens parviflora. Bei letzteren waren allein die trachealen Elemente rot gefärbt und selbst in den dickeren Partien mit voller Deutlichkeit zu übersehen.

3. Die Cuticula und die verkorkten Membranen.

§ 262. Man nahm bis vor kurzem allgemein an, dass die Verkorkung auf einer Inkrustierung der Cellulosemembran mit einer fettartigen Substanz, die man gewöhnlich als *Suberin* bezeichnete, beruhen möchte und stützte diese Annahme namentlich auf die von Fr. von Höhnel gemachte Beobachtung, nach der verkorkte Membranen sich nach der Behandlung mit wässeriger Kalilauge mit Chlorzinkjod rotviolett färben. Durch die neueren Untersuchungen von Gilson (I) wurde jedoch das Vorhandensein von Cellulose in verkorkten Membranen zum mindesten sehr in Frage gestellt; dieser Autor isolierte nämlich aus dem Kork verschiedener Gewächse eine Säure, die Phellonsäure, die sich, wie auch ihr Kaliumsalz, mit Chlorzinkjod rosa bis kupferrot färbt. Gilson nimmt nun an, dass die Ursache der violetten oder mehr rötlichen Färbung, die die mit Kalilauge behandelten Membranen durch Chlorzinkjod erleiden, in der Anwesenheit des Kaliumphellonats zu suchen sei. In der That soll denn auch die beschriebene Färbung ausbleiben, wenn die mit Kalilauge behandelten Membranen vor dem Zusatz des Chlorzinkjods mit kochendem Alkohol extrahiert werden. Die nach vorheriger Behandlung mit Chromsäure eintretende Färbung ist nach Gilson wahrscheinlich auf die Bildung freier Phellonsäure zurückzuführen. Das Unterbleiben der Färbung nach der Behandlung mit Kupferoxydammoniak beruht dagegen nicht auf der Lösung der Cellulose, son-

dern auf der Verwandlung des Kaliphellonats in das Kupfersalz, das mit Chlorzinkjod eine gelbbraune wenig charakteristische Farbe annimmt. Endlich spricht gegen die Anwesenheit von Cellulose in der Suberinlamelle der Umstand, dass nach Gilson durch andauernde Behandlung mit 3% kochender alkoholischer Lösung von Kalihydrat, die die Cellulose nachweisbar nicht angreift, die ganze Suberinlamelle zum Verschwinden gebracht werden kann.

§ 263. Ausser der bereits erwähnten *Phellonsäure,* der Gilson die Formel $C_{22}H_{43}O_8$ giebt, wurden nun von diesem Autor aus dem Kork von Quercus Suber noch zwei weitere Säuren, die *Suberinsäure* ($C_{17}H_{30}O_8$) und die *Phloionsäure* ($C_{11}H_{21}O_4$?) isoliert. Es bleibt jedoch noch unentschieden, in welcher Form diese Säuren in den verkorkten Membranen enthalten sind. Immerhin ist es nicht wahrscheinlich, dass sie dort als echte *Glycerinester* vorkommen; denn die Suberinlamelle ist in allen Lösungsmitteln für Fette unlöslich und konnte von Gilson auch nicht durch Erhitzen auf 290° zum Schmelzen gebracht werden. Die von Kügler (I, 44) ausgesprochene Ansicht, dass das Suberin deshalb so schwer löslich sein soll, weil die Suberinmolekeln zwischen die Cellulosemolekeln eingeschlossen lägen, wird unhaltbar, nachdem nachgewiesen, dass die Suberinlamelle höchstens nur Spuren von Cellulose enthält. So hat denn zur Zeit wohl die von Gilson geäusserte Ansicht, nach der das Suberin aus zusammengesetzten Aethern oder Kondensations- oder Polymerisationsprodukten der verschiedenen Säuren bestehen soll, die meiste Wahrscheinlichkeit für sich.

§ 264. Beachtenswert ist in dieser Hinsicht noch das *optische Verhalten* der verkorkten Membranen, da dasselbe auf die Form, in der die fraglichen Substanzen in der Membran vorkommen, einen Schluss zu ziehen gestattet. Die verkorkten Membranen sowohl wie die Cuticula zeigen nämlich eine ziemlich starke Doppelbrechung, und zwar sind die optischen Axen in denselben im allgemeinen umgekehrt orientiert, wie bei den reinen Cellulosemembranen. Diese Doppelbrechung verschwindet nun aber, wie Ambronn (I) gezeigt hat, vollständig beim Erwärmen auf 100° C, um beim Erkalten sofort wieder in der früheren Weise aufzutreten. Man kann sich hiervon leicht überzeugen, wenn man z. B. Querschnitte durch das Blatt von Agave americana in Glycerin bis zum Sieden der Flüssigkeit erhitzt und dann sofort im Polarisationsmikroskop beobachtet.

Das optische Verhalten des Korkes zwingt offenbar zu der Annahme, dass die Doppelbrechung innerhalb derselben auf der Anwesenheit regelmässig angeordneter Partikeln von krystallinischer Form beruht, die beim Erwärmen schmelzen, um beim nachherigen Erkalten wieder in der gleichen regelmässigen Anordnung auszukrystallisieren.

§ 265. Es bleibt jedoch noch durch weitere Untersuchungen zu entscheiden, ob alle verkorkten Membranen die gleiche Zusammensetzung besitzen und in wieweit namentlich auch die Aussenschichten der Epidermiszellen, die Cuticula und die Cuticularschichten, mit der Suberinlamelle der Korkzellen in stofflicher Beziehung übereinstimmen.

§ 266. Gegen chemische Reagentien zeigen die verkorkten Membranen sowohl wie die cuticularisierten, wie schon seit lange bekannt, folgendes Verhalten:

Sie sind unlöslich in *Kupferoxydammoniak*, färben sich mit *Jod* und *Schwefelsäure* sowie *Chlorzinkjod* niemals blau oder violett, sondern gelb oder braun und sind unlöslich in konzentrierter *Schwefelsäure.*

Besonders charakteristisch sind aber nach den Untersuchungen Fr. von Höhnels (I) folgende Reaktionen:

Konzentrierte Kalilauge bewirkt in der Kälte eine deutliche Gelbfärbung der verkorkten Membranen, die beim Erwärmen in der genannten Flüssigkeit noch an Intensität zunimmt; die verkorkten Membranen nehmen dann gleichzeitig eine gestrichelte oder körnige Struktur an, die bei weiterem Erwärmen immer deutlicher wird; beim Kochen in Kalilauge treten die gebildeten grösseren gelblichen Tropfen sogar häufig ganz aus der Membran heraus.

Dem Schulze'*schen Mazerationsgemisch* (*Salpetersäure* und *chlorsaures Kali*, cf. § 9, 1) wiederstehen die verkorkten Membranen von allen Cellulosemodifikationen am längsten, bei länger andauerndem Kochen in der genannten Flüssigkeit fliessen sie jedoch schliesslich zu ölartigen Tropfen zusammen, deren Substanz als *Cerinsäure* bezeichnet wird und in heissem Alkohol, Aether, Chloroform, Benzol und verdünnter Kalilauge löslich, in Schwefelkohlenstoff aber unlöslich ist.

Konzentrierte *Chromsäure* löst die verkorkten Membranen entweder gar nicht oder erst nach tagelanger Einwirkung, während, abgesehen von der Pilzcellulose, alle anderen Cellulosemodifikationen von dieser Säure schon nach kurzer Zeit aufgelöst werden.

§ 267. Zur *Unterscheidung der verkorkten und der verholzten Zellmembranen* können ferner auch das *Chlorophyll* und *Alkannin* benutzt werden.

Für das *Chlorophyll* wurde zunächst von Correns (II, 658 Anm.) nachgewiesen, dass es die Cuticula und die verkorkten Membranen intensiv grün färbt, während sowohl die verholzten, als auch die reinen Cellulose-Membranen farblos bleiben. Man benutzt zu dieser Färbung eine frisch bereitete möglichst konzentrierte alkoholische Chlorophyllösung, die man im Dunkeln $^1/_4$ Stunde oder beliebig länger auf die Schnitte einwirken lässt; man beobachtet die Schnitte dann zweckmässig in Wasser. Eine Konservierung dieser Präparate ist nach den gewöhnlichen Methoden jedenfalls nicht ausführbar.

Zur Färbung mit *Alkannin* benutzt man zweckmässig eine Lösung dieses Farbstoffes in 50 % Alkohol, in der man die betreffenden Schnitte einige Stunden oder beliebig länger belässt. Es nehmen dann alle verkorkten Membranen und auch die Cuticula eine rote Färbung an, die allerdings nicht so intensiv ist, wie bei etwa gleichzeitig vorhandenen Fetten oder dergl., die aber immerhin noch deutlich sichtbar ist.

Diese beiden Färbungen sind übrigens insofern von einigem Interesse, als sie von Neuem darauf hinweisen, dass in der Cuticula und im Korke fettartige Substanzen abgelagert sind.

§ 268. In ihrem *Verhalten gegen Tinktionsmittel* zeigen die cuticularisierten und verkorkten Membranen in vieler Beziehung eine Uebereinstimmung mit den verholzten. Es gilt dies namentlich von der sogenannten Suberinlamelle der Korkzellen; dahingegen ist die eigentliche Cuticula häufig weniger leicht tinktionsfähig. Uebrigens gelingt es namentlich bei dickwandigen Epidermiszellen meist leicht die Cuticularschichten differenziert zu färben, auch sind Doppelfärbungen, bei denen dieselben eine andere Färbung zeigen als die darunter liegenden Celluloseschichten ausführbar. Ich bemerke jedoch, dass diese Färbungen nicht in allen Fällen mit der gleichen Präzision eintreten, wie bei den verholzten Membranen; auch scheinen sich in dieser Hinsicht die verschiedenen Pflanzen nicht ganz gleich zu verhalten. Als geeignete Versuchsobjekte empfehle ich namentlich die Blätter von Clivia nobilis oder Agave americana. Bei diesen gelingt es leicht die folgenden Färbungen und Doppelfärbungen auszuführen. Die betreffenden Zeitangaben beziehen sich auf Mikrotomschnitte.

a) Safranin.

§ 269. Das geeignetste Tinktionsmittel für die verkorkten Membranen ist wohl *Anilinwasser-Safranin,* das durch Vermischen von gleichen Volumteilen Anilinwasser und konzentrierter alkoholischer Safraninlösung dargestellt wird. Ich lasse dasselbe ½ Stunde oder beliebig länger auf die Schnitte einwirken, begiesse dann mit Säurealkohol[1]), den ich schnell durch Alkohol ersetze; mit letzterem wird so lange ausgewaschen, bis keine Farbe mehr abgegeben wird, sodann wird in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam übertragen. War namentlich das Auswaschen mit Säurealkohol richtig getroffen, so sind bei derartigen Präparaten von den Zellmembranen allein die verholzten und die verkorkten gefärbt, und zwar zeigen die ersteren einen mehr bläulichen, die letzteren einen mehr gelblichen Farbenton.

Will man ausserdem auch die Cellulosemembranen färben, so kann dies in folgender Weise geschehen:

α) Methylblau.

Die mit Safranin gefärbten und mit Alkohol ausgewaschenen Schnitte werden in eine konzentrierte wässerige Lösung von Methylblau gestellt, in der sie ¼ Stunde oder auch länger verweilen. Sie werden dann mit Alkohol ausgewaschen und in Canadabalsam übertragen. Die Cellulosemembranen sind dann blau, die verkorkten und verholzten aber rot gefärbt.

β) Anilinblau.

Dasselbe wird ebenfalls in wässeriger Lösung angewandt, dieselbe muss aber nach der Färbung erst mit Wasser abgespült werden, da bei direktem Alkoholzusatz leicht Trübungen entstehen. Im übrigen verhält sich dasselbe ebenso wie Methylblau.

γ) Haematoxylin.

Zu einer Doppelfärbung mit Safranin und Haematoxylin kann man z. B. Böhmer'sches Haematoxylin (cf. § 315) sehr gut verwenden. Dasselbe lässt man auf die mit Safranin gefärbten und ausgewaschenen Schnitte einige Minuten lang einwirken, spült dann

---

1) D. h. Alkohol, dem ca. 0,5 % gewöhnlicher chemisch reiner Salzsäurelösung zugesetzt ist.

den Farbstoff mit Wasser ab und überträgt in Canada-Balsam. An den so behandelten Schnitten erscheinen die verholzten und verkorkten Membranen rot, die Cellulosemembranen violett.

b) Gentianaviolett und Eosin.

§ 270. Bei der sogenannten Gram'schen Färbung mit Gentianaviolett (cf. § 321) bleiben bei starkem Auswaschen mit Nelkenöl allein die verholzten und die verkorkten Membranen gefärbt; man kann nun eine sehr schöne Doppelfärbung erhalten, wenn man ganz nach der Gram'schen Methode verfährt und nur dem zum Auswaschen dienenden Nelkenöl etwas Eosin, das sich in diesem leicht löst, zusetzt. Das Eosin färbt dann sofort die Cellulosemembranen schön rot, während die Färbung der übrigen Membranen nicht geändert wird.

c) Ammoniak-Fuchsin.

§ 271. Wie zuerst von Van Tieghem nachgewiesen wurde, eignet sich Ammoniak-Fuchsin sehr gut zur Färbung verkorkter und verholzter Membranen. Dasselbe wird in der Weise dargestellt, dass man zu einer nicht allzu konzentrierten alkoholischen Lösung von Fuchsin so lange Ammoniak zusetzt, bis die Lösung nach einigem Schütteln strohgelb wird. Die Lösung wird zweckmässig nach einigen Tagen filtriert, ist aber auch in gut verschlossenen Gefässen nur einige Wochen lang haltbar.

Eine Doppelfärbung erhält man, wenn man die Schnitte zunächst für einige Minuten in die oben beschriebene ammoniakalische Fuchsinlösung bringt, dann direkt in eine wässerige Lösung von *Methylblau* taucht, in dem man sie 1/4 Stunde oder länger belässt, darauf mit Alkohol auswäscht und in Canadabalsam überträgt.

d) Cyanin und Eosin.

§ 272. Bringt man Schnitte für mehrere Stunden in eine frisch bereitete sehr verdünnte wässerige Lösung von Cyanin, die man sich z. B. zweckmässig in der Weise darstellt, dass man 20 Tropfen einer konzentrierten alkoholischen Cyaninlösung in 100 ccm Wasser bringt, so erscheinen nach dem Auswaschen in Alkohol namentlich die verholzten und verkorkten Membranen schön blau. Verwendet man dann zur Uebertragung in Canadabalsam eosinhaltiges Nelkenöl, so erhält man eine schöne Doppel-

färbung: die verholzten und verkorkten Membranen sind blau, die Cellulosemembranen rot.

Eine intensive Färbung der Cuticula erhielt ich auch, als ich Schnitte längere Zeit in einer Lösung von Cyanin in 50 % Alkohol beliess und den Farbstoff dann mit Glycerin auswusch.

4. Die verschleimten Zellmembranen, Pflanzenschleime und Gummiarten.

§ 273. Die sogenannten verschleimten Zellmembranen unterscheiden sich von den Cellulosemembranen in erster Linie durch ihr abweichendes *physikalisches* Verhalten, die *starke Quellungsfähigkeit,* und zwar kommen in dieser Hinsicht alle Uebergänge zwischen der nur relativ wenig Wasser aufnehmenden reinen Cellulose bis zu den in Wasser völlig löslichen Gummiarten, wie z. B. Gummi arabicum, vor. Zum Teil entstehen diese Körper aus der Cellulose, die meisten werden aber direkt als Schleime von der Pflanze gebildet. Ausserdem sei noch hervorgehoben, dass das Vorkommen von Pflanzenschleimen und Gummiarten innerhalb des pflanzlichen Organismus keineswegs auf die Zellmembran beschränkt ist, vielmehr können dieselben auch innerhalb des Plasmakörpers gebildet werden. Dennoch schien es mir bei der unzweifelhaften Verwandschaft dieser Körper, die man vielleicht am besten mit Beilstein (I, 877) unter der Bezeichnung *Gummiarten* zusammenfasst, am zweckmässigsten, alle diese Körper an dieser Stelle gemeinsam zu besprechen.

§ 274. Was nun das *chemische* Verhalten der Gummiarten anlangt, so ist zunächst hervorzuheben, dass die meisten derselben, soweit sie bisher analysiert wurden, in ihrer prozentischen Zusammensetzung mit der Cellulose übereinstimmen und somit der Formel $C_6H_{10}O_5$ entsprechen. Auf der anderen Seite weichen sie aber doch in ihrem chemischen Verhalten nicht unerheblich von der Cellulose ab und zeigen übrigens auch untereinander grosse Verschiedenheiten:

So nehmen die einen schon mit *Jod* allein eine blaue Färbung an, andere dagegen nur mit *Jod* und *Schwefelsäure* oder *Chlorzinkjod*, wieder andere werden durch Jodpräparate nur gelb oder überhaupt nicht gefärbt.

In *Kupferoxydammoniak* sind die Gummiarten teils löslich, teils gänzlich unlöslich.

Bei der Oxydation mit Salpetersäure geben sie teils Oxalsäure $(COOH)_2$, teils Schleimsäure $COOH . (CHOH)_4 . COOH$, teils beide Säuren.

Leider sind jedoch die chemischen Eigenschaften der verschiedenen Gummiarten, zur Zeit noch nicht mit solcher Exaktheit festgestellt, dass schon jetzt eine streng wissenschaftliche Gruppierung derselben möglich wäre. So mögen denn auch im folgenden zunächst einige Bemerkungen über die allgemeinen Nachweisungsmethoden der Gummiarten Platz finden und dann die wichtigsten chemischen Eigenschaften und speziell die mikrochemisch verwendbaren Reaktionen der bisher näher untersuchten Gummiarten zusammengestellt werden.

§ 275. Zum *mikrochemischen Nachweis* der Gummiarten kann natürlich zunächst die starke *Quellungsfähigkeit* derselben in *Wasser* benutzt werden; um den Quellungsprozess genau unter dem Mikroskope verfolgen zu können, bringt man die betreffenden Objekte vielfach zweckmässig zunächst in *absoluten Alkohol,* in dem alle Gummiarten unlöslich sind und auch nicht aufquellen, und lässt dann allmählich vom Rande des Deckglases her Wasser zutreten.

Das ungleiche Verhalten der Gummiarten gegen *Jodlösungen* und *Kupferoxydammoniak* wurde bereits hervorgehoben. Ausser diesen kann aber namentlich auch *Corallin* in vielen Fällen bei der Untersuchung der verschleimten Zellmembranen und Gummiarten verwandt werden, da manche derselben von diesem Farbstoff intensiv gefärbt werden. Man löst denselben, da er in Wasser so gut wie unlöslich ist, zweckmässig in einer konzentrierten Sodalösung; diese Lösung zersetzt sich zwar allmählich, behält aber lange Zeit ihre Färbekraft (vergl. auch § 289).

Auch mit Hanstein's *Anilingemisch* erhält man häufig charakteristische Färbungen der Pflanzenschleime.

a) Amyloid.

§ 276. Die als Amyloid bezeichnete Substanz findet sich im Samen verschiedener Gewächse (Tropaeolum majus, Impatiens Balsamina, Paeonia officinalis, viele Primulaceen u. a.) und stellt einen bei der Keimung wieder in Lösung übergehenden Reservestoff dar.

Das Amyloid ist dadurch ausgezeichnet, dass es durch *Jodlösungen* blau gefärbt wird, und zwar verwendet man zu dieser Re-

aktion nach Nadelmann (I, 616) am zweckmässigsten eine verdünnte *Jodjodkaliumlösung*, da konzentrierte Jodjodkaliumlösung das Amyloid braunorange und frische Jodtinktur dasselbe zunächst überhaupt nicht färbt.

In *Kupferoxydammoniak* ist das Amyloid unlöslich.

Charakteristisch ist ferner das Verhalten desselben gegen *Salpetersäure*. Schon in einer Säure die 30% NO_3H enthält (specifisches Gewicht 1,285), quillt nämlich das Amyloid sofort stark auf und wird nach einiger Zeit vollständig in Lösung übergeführt (cf. Reiss I, 735, 737 und 739).

Das in den genannten Samen enthaltene Amyloid ist übrigens mit der durch Behandlung mit Säuren aus der Cellulose dargestellten Verbindung, die ebenfalls vielfach als Amyloid bezeichnet wird, nicht identisch (cf. Beilstein I, 863 u. 882).

Von der Reservecellulose (cf. § 286) unterscheidet sich das Amyloid abgesehen von den bereits erwähnten Reaktionen dadurch, dass es bei der hydrolytischen Spaltung mit Schwefelsäure keine Seminose, sondern höchst wahrscheinlich Glykose liefert (Reiss I, 761).

b) Wundgummi.

§ 277. Als Wundgummi bezeichnet man jetzt gewöhnlich eine Substanz, die nach den Untersuchungen von Temme (I) sehr häufig an künstlichen und natürlichen Wundstellen von den umgebenden Amylomzellen in die Gefässe secerniert wird und wie die Thyllen einen Verschluss derselben bewirkt. Dieses Wundgummi stimmt nach Temme mit vielen Gummiarten insofern überein, als es bei der Oxydation mit Salpetersäure Oxalsäure und Schleimsäure liefern soll. Es unterscheidet sich aber dadurch wesentlich von allen Gummiarten, dass es in *Wasser nicht einmal aufquillt* und *selbst in Kalilauge und Schwefelsäure unlöslich ist*. Wie schon von Temme nachgewiesen wurde, färbt sich das Wundgummi mit *Phloroglucin* und Salzsäure intensiv rot; von Molisch (IV, 290) wurde später gezeigt, dass dasselbe sich auch gegen *Anilinsulfat*, *Metadiamidobenzol*, *Orcin* und *Thymol* ganz wie die verholzten Membranen verhält, und es wird denn auch von Molisch angenommen, dass der Wundgummi *Vanillin* aufgelöst enthält (cf. § 254).

c) Die Gallertbildungen der Conjugaten.

§ 278. Bei zahlreichen Zygnemaceen findet man die ganze Oberfläche der Zellfäden von einer farblosen Hülle, einer »*Gallertscheide*« umgeben, während bei den Desmidiaceen die Gallertausscheidung häufig auf ganz bestimmte Stellen der Membran beschränkt ist (cf. Klebs (II) und Hauptfleisch I).

Da der Brechungsindex dieser Gallertscheiden von dem des Wassers nur wenig abweicht, sind sie im ungefärbten Zustande häufig nur mit Hilfe starker Objektive gut zu erkennen. Sie treten aber auch bei Anwendung schwächerer Systeme sehr deutlich hervor, wenn man die betreffenden Algen nach der von Errera (III) vorgeschlagenen Methode in möglichst fein verriebene chinesische Tusche bringt. Man verreibt zu diesem Zwecke am einfachsten direkt auf dem Objektträger soviel von der echten chinesischen Tusche, bis der Tropfen dunkelgrau erscheint und bringt dann die zu untersuchenden Alge in denselben hinein.

Ueber die *chemische Zusammensetzung* dieser Gallertmassen lassen sich zur Zeit noch keine zuverlässigen Angaben machen; erwähnen will ich in dieser Hinsicht nur, dass dieselben weder mit *Jod* und *Schwefelsäure,* noch mit *Chlorzinkjod* die Cellulosereaktionen geben und dass sie gegen die Cellulosemembran, mit der sie sicher nicht im genetischen Zusammenhange stehen, immer scharf abgegrenzt sind.

Eine eingehendere Besprechung verlangen jedoch eine Anzahl von Beobachtungen, die namentlich von Klebs (II) an den Gallertscheiden der Zygnemaceen gemacht wurden und zeigen, dass dieselben eine sehr komplizierte Organisation besitzen müssen.

§ 279. Zunächst konstatierte Klebs, dass die Gallertscheiden, stets aus zwei verschiedenen Substanzen bestehen, von denen die eine mit heissem Wasser ausgezogen werden kann und ferner dadurch ausgezeichnet ist, dass sie mit gewissen Farbstoffen, wie *Methylenblau, Methylviolett* und *Vesuvin* ziemlich intensiv tingiert wird, während die in heissem Wasser unlösliche Substanz in den genannten Farbstoffen vollkommen farblos bleibt. Nach Färbung mit einem der genannten Farbstoffe beobachtet man nun in den Scheiden zarte Stäbchen, die in ihrem dem Zelllumen zugewandten Teile häufig zu einem feinen Netzwerk vereinigt erscheinen (cf. Fig. 33, I). Die nämliche Struktur kann übrigens auch durch

andere Mittel, namentlich durch Alkohol, sichtbar gemacht werden; sie beruht offenbar darauf, dass die verschiedenen Substanzen in der Gallertscheide ungleichmässig verteilt sind.

§ 280. Eine weitere merkwürdige Eigenschaft der Gallertscheiden besteht darin, dass sie nach Einlagerung gewisser Niederschläge, wie z. B. Berliner Blau, diese in Gemeinschaft mit einem mehr oder weniger grossen Teile der in Wasser löslichen Substanz der Gallertscheiden unter Verquellung nach aussen abstossen (cf. Fig. 33 II und III). Diese »*Abstossung der Gallertscheiden*« beginnt damit, dass die zuvor gleichmässig über die Membran verteilten Teilchen sich zu deutlichen Körnchen zusammenballen (cf. Figur 33, III), welche von dem mitgerissenen Schleim verklebt werden und schliesslich mit diesem abgestossen werden.

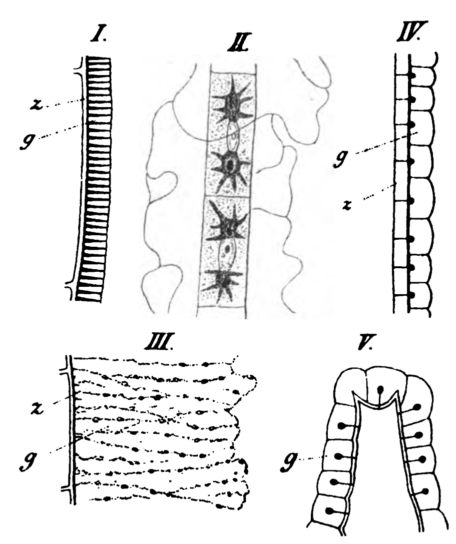


Fig. 33. I. Membran und Gallertscheide von Zygnema spec. (580). II. Zwei Zygnemazellen nach Einlagerung von Chromgelb (245). III. Membran und Gallertscheide von Zygnema nach Einlagerung von Chromgelb (245). IV. Id. von Pleurotaenium Trabecula, nach Färbung mit Fuchsin (950). V. Id. von Staurastrum bicorne, nach Färbung mit Gentianaviolett (950). z Zellmembran, g Gallertscheide. I—III nach Klebs, IV und V nach Hauptfleisch.

Die Abstossung lässt sich durch sehr verschiedenartige Niederschläge hervorrufen. Sehr geeignet ist z. B. Chromgelb (CrO_4Pb), das man in der Weise in den Membranen niederschlägt, dass man die zweckmässig mit einem Faden zusammengebundenen Algen zunächst für wenige Minuten in eine 0,25% Lösung von Kaliumchromat (CrO_4K_2) taucht, dann schnell in Wasser umschwenkt und darauf in eine 0,25% Lösung von Bleiacetat einträgt. Um einen stärkeren Niederschlag zu erhalten, muss man diese Prozedur jedoch mehrmals wiederholen. Uebrigens erfolgt die Abstossung um so schneller, je weniger Chromgelb eingelagert war, bei starker Einlagerung ist sie meist erst nach mehreren Tagen vollendet.

Erwähnen will ich schliesslich noch, dass die Abstossung von

der Lebensfähigkeit des Plasmakörpers direkt nicht abhängig ist und unter Umständen auch an getöteten Individuen erfolgt.

§ 281. Sodann hat Klebs noch die bemerkenswerte Thatsache konstatiert, dass die Gallertscheiden in einer Lösung von Glykose und Pepton bedeutend an Dichtigkeit zunehmen durch Einlagerung einer ihrer Zusammensetzung nach noch nicht ermittelten Substanz. Diese »*Verdickung*« der Gallertscheiden tritt jedoch nur dann ein, wenn gleichzeitig lösliche Eiweissstoffe und eine Zuckerart in der umgebenden Flüssigkeit enthalten sind und ist, wie die besprochene Abstossung, unabhängig von der Lebensfähigkeit des Plasmakörpers.

§ 282. Nach den Untersuchungen von Hauptfleisch (I) bestehen dagegen die Gallertbildungen der *Desmidiaceen* aus einzelnen Prismen oder Kappen, von denen jede einem Porus der Zellmembran aufsitzt. Diese Poren sind durchsetzt von Plasmasträngen, die nach aussen gewöhnlich in eine kugelförmige Anschwellung endigen, die bei den verschiedenen Arten mehr oder weniger weit in die Gallerthüllen hineinragen (cf. Fig. 33, IV und V).

Zur Beobachtung dieser Strukturverhältnisse empfiehlt der genannte Autor zu den unter Deckglas befindlichen lebenden Algen vom Rande her zunächst verdünnte und dann allmählich konzentriertere Lösung von Safranin, Fuchsin, Gentianaviolett, Methylenblau oder Methylviolett hinzufliessen zu lassen und die Veränderungen der Gallerte während der Einwirkung dieser Farbstoffe zu verfolgen. Eventuell kann man auch durch vorsichtiges Auswaschen die Veränderungen der Gallerte nochmals rückwärts verfolgen.

Das Vorhandensein zweier verschiedener Substanzen innerhalb der Gallerthüllen wird von Hauptfleisch für die Desmidiaceen bestritten.

5. Die Pilzcellulose.

§ 283. Die Membranen der Pilze zeigen ein sehr verschiedenartiges Verhalten. Bei einer Anzahl derselben geben sie zwar die normalen Cellulosereaktionen, und zwar ist dies namentlich in den jugendlichen Stadien der Fall (cf. de Bary II, 9); bei den meisten Pilzen unterscheiden sie sich aber dadurch von den reinen Cellulosemembranen, dass sie sich mit *Jod* und *Schwefelsäure* so-

wie mit *Chlorzinkjod* nur gelb oder braun färben und in *Kupferoxydammoniak* unlöslich sind; ebenso zeigen sie auch gegen *Alkalien* und *Säuren* im allgemeinen eine hohe Resistenzfähigkeit. Da sie nun aber auf der anderen Seite auch nicht die Reaktionen auf Verholzung oder Verkorkung geben, scheint es zur Zeit geboten, in ihnen eine besondere Modifikation der Cellulose anzunehmen, die man gewöhnlich als *Pilzcellulose* bezeichnet.

Bemerkenswert ist in dieser Hinsicht noch, dass nach den Untersuchungen von K. Richter (I) die Membranen einer grossen Anzahl von Pilzen die Reaktionen auf reine Cellulose geben, wenn sie vorher längere Zeit mit Kalilauge behandelt sind. In vielen Fällen ist hierzu allerdings eine wochenlange Einwirkung der Kalilauge notwendig.

Dahingegen erhielt neuerdings W. Hoffmeister (I, 254) unter Anwendung der bei den höheren Gewächsen stets zum Ziele führenden Methoden aus dem Fruchtkörper des Steinpilzes keine auf Cellulose reagierenden Verbindungen. Die Membranen dieses Pilzes sind nach den Untersuchungen des genannten Autors auch dadurch ausgezeichnet, dass sie in konzentrierter Salzsäure und Natronlauge vollständig löslich sind.

§ 284. *Die Membran der Bakterien.* Darüber, dass auch die Bakterien eine feste Zellmembran besitzen, kann zur Zeit kein Zweifel mehr bestehen. In den meisten Fällen kann man sich von dem Vorhandensein derselben leicht überzeugen, wenn man die betreffenden Organismen plasmolysiert (cf. § 431 u. 463).

Ueber die chemische Zusammensetzung dieser Membranen lassen sich zur Zeit noch keine zuverlässigen Angaben machen. Zum Teil scheinen dieselben übrigens aus Cellulose zu bestehen, wenigstens wurde von W. Hoffmeister (I, 253) aus einem nicht näher bestimmten Bacillus eine auf Cellulose reagierende Substanz isoliert.

6. Paragalactanartige Substanzen.

§ 285. Von Reiss und E. Schulze wurde der Nachweis geliefert, dass namentlich in den Zellmembranen der mit erheblichen Wandverdickungen versehenen Samen Kohlehydrate vorkommen, die sich von der Cellulose wesentlich unterscheiden und bei der Keimung, wie die anderen Reservestoffe des Samens, in Lösung übergeführt werden. Die eine dieser Substanzen wurde

von Reiss als *Reservecellulose*, eine andere von Schulze als *Paragalactan* bezeichnet; es ist jedoch wahrscheinlich, dass noch verschiedene verwandte Verbindungen existieren. Alle diese Stoffe werden wohl zur Zeit am zweckmässigsten unter der von E. Schulze vorgeschlagenen Bezeichnung »*paragalactanartige Verbindungen*« zusammengefasst.

a) Reservecellulose nach Reiss.

§ 286. Die sogenannte Reservecellulose wurde von Reiss (I) aus dem Endosperm von Phoenix dactylifera, Phytelephas und verschiedenen anderen mit stark verdickten Membranen versehenen Samen dargestellt. Sie unterscheidet sich von der gewöhnlichen Cellulose namentlich durch die bei der durch Schwefelsäure bewirkten *Hydrolyse* entstehenden Produkte. Bei dieser wird nämlich zuerst eine dem Dextrin entsprechende aber linksdrehende Verbindung (*Seminin*) und dann eine rechtsdrehende, Fehling'sche Lösung reduzierende und gährungsfähige Zuckerart (*Seminose*) gebildet, die namentlich dadurch charakterisiert ist, dass sie mit essigsaurem Phenylhydrazin ($C_6H_5NH.NH_2$) ein krystallisiert zu erhaltendes Hydrazon von der Zusammensetzung $C_{12}H_{18}N_2O_5$ bildet, wahrscheinlich nach der Formel: $C_6H_{12}O_6 + C_6H_8N_2 = C_{12}H_{18}O_5N_2 + H_2O$. Mikrochemisch soll sich die Reservecellulose von der gewöhnlichen Cellulose nicht unterscheiden lassen, und sich namentlich auch gegen Jodlösungen und Kupferoxydammoniak ganz wie reine Cellulose verhalten.

Eine Abweichung zeigen nur die Zellwände des Endosperms von Paris quadrifolia und Foeniculum officinale, die in Kupferoxydammoniak unlöslich sind, obwohl sie ebenfalls bei der hydrolytischen Spaltung Seminose geben und somit als Reservecellulose aufzufassen sind.

b) Paragalactan.

§ 287. Als Paragalactan bezeichnet E. Schulze (cf. Schulze I. und Schulze, Steiger und Maxwell I) eine neben echter Cellulose in den Wandverdickungen der Cotyledonzellen von Lupinus luteus nachgewiesene Verbindung, die übrigens sehr wahrscheinlich auch bei anderen Leguminosen vorkommt. Dieselbe liefert bei der Oxydation mit *Salpetersäure* Schleimsäure, beim Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure Galactose ($C_6H_{12}O_6$) und

eine Pentaglykose. Sie ist ferner dadurch charakterisiert, dass sie beim Erhitzen mit *Phloroglucin* und Salzsäure eine kirschrote Flüssigkeit giebt, während in der Kälte keine Färbung eintritt. Beim Erhitzen wird das Paragalactan schon durch 1% Salzsäure oder 1% Schwefelsäure in Zucker übergeführt, während die Cellulose nur von bedeutend konzentrierteren Lösungen angegriffen wird.

Für den mikrochemischen Nachweis des Paragalactans ist von Wichtigkeit, dass dasselbe in *Kupferoxydammoniak* unlöslich ist und auch die Lösung der in diesen Membranen gleichzeitig vorkommenden Cellulose verhindert, während diese nach Auflösung des Paragalactans durch siedende 2,5% Salzsäure zum Kupferoxydammoniak leicht in Lösung übergeführt wird. Durch *Chlorzinkjod* scheint das Paragalactan nicht gefärbt zu werden, wenigstens zeigten die mit diesem Reagenz behandelten Membranen nur schwache Bläuung, während dasselbe das nach Auflösung des Paragalactans restierende Membrangerüst intensiv färbt.

7. Callose, Callus der Siebröhren.

§ 288. Als *Callus* bezeichnete man bis vor kurzem allgemein eine ziemlich stark lichtbrechende Substanz, die bei älteren Siebröhren eine mehr oder weniger vollständige Verstopfung der Siebporen bildet und schliesslich die ganzen Siebplatten mit einem dicken Polster überzieht. Von Mangin (I—III) wurde jedoch neuerdings die allgemeinere Verbreitung dieser Substanz nachgewiesen, so namentlich in den Membranen verschiedener Pollenkörner und Pollenschläuche und bei zahlreichen Pilzen. Sehr verbreitet ist dieselbe z. B. in dem Mycel der Peronosporeen, wo sie teils die Cellulose-Membranen inkrustiert, teils auch in mehr oder weniger reinem Zustande im Inneren der Mycelfäden und Haustorien auftritt (cf. Mangin, III).

Der genannte Autor bezeichnet diese Substanz jedoch als *Callose*, ein Ausdruck, der auch jedenfalls den Vorzug verdienen dürfte, da ja das Wort »Callus« bekanntlich auch in einem ganz anderen Sinne gebraucht wird.

§ 288. Die Callose zeigt nun nach Mangin (II) folgende Reaktionen: sie ist unlöslich in *Wasser, Alkohol* und *Kupferoxydammoniak,* in letzterem selbst nach vorausgehender Behandlung mit Säuren; sie ist dagegen leicht löslich in einer kalten 1% Lö-

sung von *Aetznatron* oder *Aetzkali*, ausserdem ist sie schon in der Kälte löslich in konzentrierter *Schwefelsäure*, sowie in konzentrierten Lösungen von *Chlorcalcium* oder *Zinnchlorid.* Kalte Lösungen von *Alkalikarbonaten* und *Ammoniak* lassen sie quellen und verleihen ihr eine gallertige Konsistenz, ohne sie aber zu lösen.

Ausserdem unterscheidet sich die Callose von der Cellulose auch in ihrem Verhalten gegen verschiedene *Farbstoffe.* So führt Mangin (V) zunächst eine Anzahl von Azofarben an, die in neutraler oder schwach saurer Lösung die Cellulose stark färben, die Callose aber ungefärbt lassen: es sind dies namentlich *Orseillin BB, Azorubin, Naphtolschwarz* und die *Croceïne.* Auf der anderen Seite ist die Callose durch starke Tinktionsfähigkeit durch *Corallin* und *Anilinblau* und gewisse zu den *Benzidinen* und *Tolidinen* gehörige Farbstoffe ausgezeichnet.

§ 289. *Corallin* oder *Rosolsäure* wird zweckmässig in einer 4 % oder konzentrierten wässerigen Sodalösung gelöst; in diese Farbstofflösung werden die betreffenden Schnitte auf kurze Zeit hineingetaucht und dann in Glycerin untersucht, in dem, wenn die Färbung richtig getroffen, im Siebteil die allein intensiv rotgefärbten Callosepolster sofort scharf hervortreten. Sehr zweckmässig fand ich es auch, die Schnitte zunächst mit der Corallinlösung sehr intensiv zu überfärben und dann mit 4 % Sodalösung auszuwaschen, die alle Zellteile bis auf die Callose schnell entfärbt. Diese Methode hat mir namentlich bei den Pilzen gute Dienste geleistet. Die mit Corallin gefärbten Präparate können nicht für längere Zeit konserviert werden.

§ 290. *Anilinblau* wurde von Russow (I) zur Tinktion der Callose der Siebröhren empfohlen. Dasselbe wird zweckmässig in verdünnter wässeriger Lösung angewandt, die man ½ Stunde oder länger auf die Schnitte wirken lässt. Ueberfärbte Schnitte können mit Glycerin ausgewaschen werden. Dieselben sind richtig gelungen, wenn an ihnen allein die Callosepolster intensiv gefärbt erscheinen. Ziemlich stark färben sich übrigens in dem Anilinblau auch die Schlauchköpfe der jungen Siebröhren. Zur Unterscheidung dieser von der Callose kann man zweckmässig die Präparate mit wässeriger *Eosinlösung* nachfärben, in der man dieselben wenige Minuten belässt. Nach kurzem Auswaschen in Glycerin erscheint dann der gesammte Inhalt der Siebröhren einschliesslich der die Siebplatten durchsetzenden Plasmafäden vio-

lett oder rein rot, während die Callosepolster intensiv blau geblieben sind. Die so behandelten Präparate lassen sich ebenso, wie die mit Anilinblau allein gefärbten, in Glyceringelatine gut konservieren. Uebrigens können dieselben auch in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam übertragen werden.

Bei Pilzen lieferte mir übrigens das Anilinblau, da es häufig auch das Plasma ziemlich intensiv tingiert, meist viel weniger instruktive Bilder als die Rosolsäure.

§ 291. Charakteristisch ist auch das bisher nur bei den Callosepolstern der Siebröhren genauer geprüfte Verhalten der Callose gegen *Jodreagentien,* die nach Lecomte (I, 268) die feinere Struktur dieser Gebilde am besten hervortreten lassen sollen. Chlorzinkjod färbt die Callose zunächst je nach dem Jodgehalt ziegelrot oder rotbraun, Chlorcalciumjodlösung (cf. § 246, 5) dagegen rosa, nach vorheriger Behandlung mit Anilinblau weinrot, während die Siebplatte sich violett färbt.

8. Pectinstoffe.

§ 292. Von Mangin (IV—VI) wurde neuerdings auf mikrochemischem Wege der Nachweis geliefert, dass in den Zellmembranen der verschiedenartigsten Gewächse Pectinstoffe (Pectin, Pectose und Pectinsäuren) sehr verbreitet sind und dass dieselben namentlich die sogenannte Intercellularsubstanz der unverholzten und unverkorkten Membranen bilden.

§ 293. Zum mikrochemischen Nachweis der Pectinstoffe benutzt Mangin (IV und VI) zunächst verschiedene *Farbstoffe:* Phenosafranin, Methylenblau, Bismarckbraun, Fuchsin, Victoriablau, Violet de Paris (identisch mit Methylviolett B) und Rosolan (= Mauveïn) u. a. Diese sollen die reine Cellulose nicht färben, wohl aber die Pectinstoffe und zwar sowohl in neutraler Lösung als auch nach schwacher Ansäuerung mit Essigsäure. Ausserdem werden nun allerdings auch die verholzten und verkorkten Membranen durch diese Farbstoffe gefärbt. Es besteht aber insofern ein Unterschied zwischen diesen und den Pectinstoffen, als letztere schnell durch Alkohol, Glycerin und Säuren entfärbt werden, während die verholzten und verkorkten Membranen in diesen Flüssigkeiten gefärbt bleiben. Ausserdem führt Mangin auch eine Anzahl von Farbstoffen an, die auch in neutraler Lösung die

Pectinstoffe ungefärbt lassen, während sie eine intensive Färbung der verholzten und verkorkten Membranen bewirken. Solche Farbstoffe sind: das Säuregrün, Säurebraun, Nigrosin, Indulin, die Croceïne und die Ponceaux. Durch Mischen eines dieser Farbstoffe mit einem der obengenannten erhielt Mangin instruktive Doppelfärbungen.

Auf der anderen Seite führt Mangin (V) neuerdings noch eine Anzahl von Farbstoffen an, die die Pectinstoffe ungefärbt lassen, aber die Cellulose oder auch die Cellulose und die Callose färben sollen. Zu den ersteren gehören z. B. Orseillerot A, Naphtolschwarz und die Croceïne, während z. B. Congorot, Azoblau und Benzopurpurin Cellulose und Callose färben sollen.

§ 294. Um nun aber zu zeigen, dass die zuerst beschriebenen Färbungen wirklich auf der Anwesenheit von Pectinstoffen beruhen, behandelt Mangin zarte Schnitte 24 Stunden mit Kupferoxydammoniak und wäscht sie dann in Wasser und 2% Essigsäure aus. Bei dieser Behandlung tritt die Cellulose aus den Membranen heraus und erfüllt als gelatinöse Masse die Intercellularen und das Lumen der Zellen. Infolgedessen färben sich auch bei Zusatz von Chlorzinkjod oder dergleichen die Membranen gar nicht oder schwach gelb, während im Inneren der Zellen eine intensiv blaue Färbung auftritt. Die nun aus reiner Pectinsäure bestehenden Membranen färben sich dagegen intensiv mit Safranin oder Methylenblau; es genügt ferner einige Tropfen einer Lösung von oxalsaurem Ammon zuzusetzen, um eine Auflösung der Pectinsäure-Membranen zu bewirken.

§ 295. Um speziell den Nachweis zu liefern, dass die Mittellamelle der sogenannten Cellulosemembranen aus Pectinsäure resp. einem unlöslichen Salze derselben besteht, lässt Mangin (VI) auf dünne Schnitte 24 Stunden lang ein Gemisch von 1 Teil Salzsäure und 4—5 Teilen Alkohol einwirken, wäscht sie dann mit Wasser aus und behandelt sie darauf mit schwacher — etwa 10% — Ammoniaklösung. Nach kurzer Einwirkung lassen sich dann die Schnitte durch gelinden Druck in die einzelnen Zellen zerlegen. Mangin erklärt dies in der Weise, dass durch den Säure-Alkohol aus der ursprünglichen unlöslichen Pectinsäureverbindung die Pectinsäure freigemacht werde, die dann in der Ammoniaklösung sich auflöst. In der That wurde auch aus der ammoniakalischen Lösung durch Säurezusatz eine gelatinöse Masse gefällt, die alle Eigenschaften der Pectinsäure besitzt. Auf der

anderen Seite zeigten auch Schnitte, die nach der Behandlung mit Säurealkohol in Kalk- oder Barytwasser getaucht waren, bei dem nachherigen Eintauchen in Ammoniak keinen Zerfall in die einzelnen Zellen, weil die Pectinsäure sich mit den alkalischen Erden wieder zu einem unlöslichen Salze verbunden hatte.

§ 296. Eine intensive Färbung der Mittellamelle erhielt Mangin (VI), wenn er dünne Schnitte durch ausgewachsene Pflanzenteile nach der Behandlung mit dem oben erwähnten Salzsäure-Alkoholgemisch mit Phenosafranin oder Methylenblau färbte. Es färbt sich dann die aus Pectinsäure bestehende Mittellamelle viel intensiver, als die der Cellulose beigemengten Pectinverbindungen der Zellwandverdickungen.

9. Aschen- und Kieselskelette der Zellmembran.

§ 297. Die anorganischen Salze, welche sämtliche pflanzlichen Zellenmembranen inkrustieren, sind in vielen Fällen in solcher Menge vorhanden, dass sie nach der Zerstörung aller organischen Substanzen durch Glühen noch vollständig die Gestalt der früheren Membran erkennen lassen.

Derartige *Aschenskelette* kann man z. B. durch Glühen von Stengelquerschnitten von Cucurbita Pepo auf dem Deckgläschen mit Leichtigkeit erhalten. Sie müssen aber, da sie in Wasser mindestens zum Teil löslich sind, in Luft beobachtet werden. Diese Aschenskelette bestehen vorwiegend aus *Kali-* und *Kalksalzen.* In anderen Fällen findet sich auch *Kieselsäure* in grosser Menge innerhalb der Membran abgelagert. Bezüglich der zum Nachweis dieser dienenden Methoden vergl. § 78—81.

10. Zur Entwickelungsgeschichte der Zellmembran.

§ 297a. Bei der Untersuchung des *Wachsthums* der Zellmembranen kann es vielfach von Wichtigkeit sein, die Membranen ohne Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der betreffenden Zellen zu färben. Lässt man dann die so behandelten Objekte in reinem Wasser weiter wachsen, so erscheint es möglich, die *neugebildeten Membranen oder Membranpartien von den bereits zuvor vorhandenen mit Sicherheit zu unterscheiden.*

Noll (I) verfuhr nun zu diesem Zwecke bei Caulerpa und

einigen anderen Meeresalgen in der Weise, dass er in sämtlichen Membranen der betreffenden Versuchspflanzen, ohne ihre Lebensfähigkeit zu schädigen, einen Niederschlag von *Berliner* oder Turnbull's *Blau* erzeugte und dieselben dann unter günstigen Kulturbedingungen weiter wachsen liess. Es mussten dann offenbar die neugebildeten Membranen farblos sein und die etwa durch Intussusception gewachsenen eine entsprechend hellere Färbung zeigen.

§ 297 b. Um nun einen Niederschlag von *Berliner Blau* in den Membranen zu erzeugen, brachte Noll (I, 111) die betreffenden Algen zunächst für eine oder einige Sekunden in ein Gemisch von 1 Teil Seewasser und 2 Teilen Süsswasser, dem soviel *Ferrocyankalium* zugesetzt war, dass die Lösung mit dem Seewasser gleiches spezifisches Gewicht besass. Darauf wurden die Algen durch ein Gefäss mit reinem Seewasser rasch durchgezogen und dann für ½ bis 2 Sekunden in ein Gemisch von 2 Teilen Seewasser, 1 Teil Süsswasser und einigen Tropfen *Eisenchlorid*[1]) getaucht. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Verfahrens lässt sich die Färbungsintensität noch bedeutend erhöhen.

Zur Erzeugung von Turnbull's *Blau*, das übrigens der genannte Autor für weniger geeignet hält, benutzte er entsprechende Lösungen von *Ferridcyankalium* und *milchsaurem Eisenoxydul.*

§ 297 c. Hervorzuheben ist nun aber bezüglich dieser Färbungen zunächst, dass sie allmählich — wahrscheinlich durch Alkaliausscheidung — zerstört werden. Sie können aber jederzeit wieder von Neuem dadurch hervorgerufen werden, dass die betreffenden Algen in eine mit reiner Salzsäure angesäuerte Lösung von Ferro- (resp. Ferrid-) cyankalium gebracht werden.

Schliesslich sei noch bemerkt, dass nach den Untersuchungen von Noll durch diese Manipulationen die Lebensfähigkeit der betreffenden Algen nicht gestört wird, und dass, soweit keine chemische Differenzen vorliegen, der Niederschlag in dieser Weise in den betreffenden Membranen ganz gleichmässig abgelagert wird, so dass diese in allen Schichten die gleiche Färbungsintensität zeigen.

§ 297 d. In ähnlicher Weise, wie das Berliner-Blau, wurde

1) Diese Lösung muss, da sie sich in kurzer Zeit zersetzt, vor dem jedesmaligen Gebrauch frisch hergestellt werden.



neuerdings von Zacharias (IV, 488) auch das *Congorot* benutzt. Der genannte Autor operierte mit Wurzelhaaren von Lepidium, die er für 15—30 Minuten in eine Lösung von Congorot in Leitungswasser tauchte und dann in feuchter Luft weiter wachsen liess. Da jedoch am Lichte eine Zerstörung des Congorots eintritt, müssen die betreffenden Keimlinge im Dunkeln kultiviert werden.

§ 297e. Das *Congorot* war übrigens bereits früher von Klebs (III, 502) bei der Untersuchung des Membranwachstums von verschiedenen Algen angewandt worden. Dieser Autor fand nämlich, dass das Congorot die bemerkenswerte Eigenschaft besitzt, dass es die bereits vorhandenen Membranen ganz oder fast ganz farblos lässt, während es den in demselben neu entstehenden Membranen eine rote Farbe verleiht. Klebs benutzte bei diesen Versuchen eine 0,01% Lösung von *Congorot* oder eine geeignete Kulturflüssigkeit, der die gleiche Menge des genannten Farbstoffes zugesetzt war. Hervorzuheben ist jedoch, dass bei den Versuchen von Klebs das den Membranen eingelagerte Congorot das Flächenwachstum derselben stark beschränkte oder gar ganz verhinderte, während das Dickenwachstum um so mehr gesteigert und die Lebensfähigkeit der betreffenden Zellen in keiner Weise gestört wurde.

11. Die feinere Struktur der Zellmembranen.

§ 297f. Zahlreiche Zellmembranen, namentlich solche von erheblicherer Dicke sind bekanntlich parallel der Oberfläche in verschiedenartige Lamellen oder Schichten gegliedert (»*Schichtung*«). Bei manchen treten ferner innerhalb derselben Schicht bandförmige Differenzierungen auf, die nach Correns (III, 324) stets spiralig verlaufen (»*Streifung*«). Schliesslich findet man auch nicht selten radialverlaufende Lamellen von abweichendem optischen Verhalten (»*Querlamellierung*«).

Die Beobachtung dieser Membrandifferenzierungen gelingt nun in vielen Fällen schon an den unveränderten Membranen; im allgemeinen treten dieselben aber viel deutlicher hervor, wenn dieselben zuvor mit Quellungsmitteln behandelt sind, und zwar ist zu diesem Zwecke ausser den im § 10 aufgeführten Quellungsmitteln namentlich auch Chlorzinkjod in manchen Fällen sehr geeignet.

§ 297 g. Als *Ursachen der beschriebenen optischen Erscheinungen* können nun, wie neuerdings von Correns (III) eingehend erörtert wurde, 3 Faktoren in Frage kommen: I. *Membransculptur*, II. *Membrandifferenzierung in Streifen oder Schichten von ungleichem Wassergehalt bei gleicher chemischer Zusammensetzung* und III. *Membrandifferenzierungen, die bei gleichem Wassergehalt ungleiche Lichtbrechung besitzen und also auf stofflicher Verschiedenheit beruhen.* Ausserdem sind nur noch Kombinationen dieser 3 Faktoren möglich.

§ 297 h. Auf *Membransculptur* kann nun namentlich die *Streifung* beruhen. Uebrigens fällt dieselbe dann einfach in die Kategorie der partiellen Membranverdickungen und verdient auch nur deshalb an dieser Stelle berücksichtigt zu werden, weil sie bei grosser Zartheit nur sehr schwer von den echten Membrandifferenzierungen unterschieden werden kann und auch häufig mit diesen Hand in Hand geht.

Die auf Membransculptur beruhende Streifung ist nun offenbar nur dann sichtbar, wenn die betreffenden Membranen und die Einschlussflüssigkeit ungleichen Brechungsindex besitzen. Sie wird um so deutlicher, je grösser dieser Unterschied ist, und verschwindet gänzlich bei Gleichheit der Brechungsindices. Nahezu die gleiche optische Dichtigkeit als die Zellmembranen besitzt z. B. der Canadabalsam; auf der anderen Seite wurde der Methylalkohol wegen seines geringen Brechungsindex von Correns ebenfalls mit Erfolg angewandt. Derselbe beträgt nämlich nur 1,321 und ist also noch kleiner als der des Wassers (1,336).

§ 297 i. Ferner leuchtet ein, dass es bei den lediglich auf Membransculptur beruhenden Differenzierungen im Gegensatz zu denjenigen, die ausschliesslich auf ungleichen Wassergehalt zurückzuführen sind, gleichgiltig sein muss, ob die betreffenden Membranen im trockenen oder imbibierten Zustande in die Einschlussflüssigkeit von gleichem Brechungsindex, wie z. B. Canadabalsam, gebracht werden. Die Anwendung dieses Kriteriums stösst aber, wie von Correns (III, 260) gezeigt wurde, auf Schwierigkeiten, sobald Spalten oder Kanäle im Inneren der Membranen in Frage kommen, wie z. B. bei den Bastzellen von Nerium, wo die verschiedenen Schichten verschiedene Streifensysteme besitzen. Es scheint in diesem Falle nicht ausführbar, die betreffenden kapillaren Räume ohne Entfernung des Imbibitionswassers mit ätherischem Oele oder Balsam zu erfüllen.

Immerhin kann jedoch auch in diesem Falle das Verhalten der ausgetrockneten Membran beim Einbetten in Canadabalsam oder dergl. gewisse Schlüsse auf die Natur der fraglichen Differenzierungen gestatten, insofern aus kapillaren Räumen im Inneren der betreffenden Membranen nur eine langsame Verdrängung der eingeschlossenen Luft stattfinden könnte.

Zur Unterscheidung wasserführender Spalten und wasserreicherer Substanz können ferner auch Chlorzinkjod und verschiedene Farbstoffe benutzt werden; offenbar müssen an geeigneten Schnitten die Kapillarräume stets als farblose Streifen hervortreten, während die wasserreicheren Partien eine mehr oder weniger intensive Tinktion zeigen können.

§ 297k. II. Die *auf ungleichem Wassergehalt beruhenden Differenzierungen* müssen offenbar im allgemeinen beim Austrocknen verschwinden. Man kann also das Vorhandensein derartiger Differenzierungen dadurch nachweisen, dass man die betreffenden Objekte in der gleichen wasserfreien Einschlussflüssigkeit, wie z. B. Canadabalsam, teils im feuchten, teils im wasserfreien Zustande beobachtet. Hiebei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die völlige Wasserentziehung nur durch *Austrocknenlassen* — je nach der Beschaffenheit der Objekte bei 50 bis 100° — erreicht werden kann, dass dagegen die von verschiedenen Autoren zu dem gleichen Zwecke angewandten »*wasserentziehenden Mittel*«, wie namentlich absoluter Alkohol, nicht zu beweiskräftigen Resultaten führen können (cf. Zimmermann I, 87).

§ 297 l. Ausserdem ist zu berücksichtigen, dass bei ungleichem Wassergehalt mit dem Austrocknen stets auch Gestaltsveränderungen der betreffenden Objekte eintreten müssen und dass somit, wie neuerdings von Correns (III, 262) speziell ausgeführt wurde, aus dem Vergleich zwischen ausgetrockneten und feuchten Membranen keineswegs in allen Fällen eine sichere Unterscheidung zwischen den auf Membranskulptur und ungleichem Wassergehalt beruhenden Differenzierungen abgeleitet werden kann. Bezüglich der in dieser Beziehung vorhandenen Möglichkeiten sei auf die Arbeit von Correns (III) verwiesen.

§ 297 m. Sodann wurde ferner von Correns (III, 294) das Vorhandensein von Wassergehaltsdifferenzen in der Weise dargethan, dass er Membranen mit einer Salzlösung imbibierte, die nachweisbar nicht gespeichert wird. Es war dann offenbar der Schluss gestattet, dass an denjenigen Stellen, wo das Salz in grös-

serer Menge vorhanden war, dies die Folge grösseren Wassergehaltes war. Correns benutzte zu diesem Zwecke Ferrocyankalium und Silbernitrat und machte das in den Membranen enthaltene Salz durch Verwandlung in einen gefärbten Niederschlag sichtbar.

Bezüglich der Anwendungsweise des *Ferrocyankaliums* sei hervorgehoben, dass Correns die zuvor in viel Wasser ausgewaschenen und dann durch Erwärmen auf 50—100° ausgetrockneten Membranen für wenige Minuten in eine 10% Lösung der genannten Substanz brachte und dann nach äusserlichem Abtrocknen zwischen Fliesspapier, ohne sie vorher auszuwaschen, in eine verdünnte *Eisenchloridlösung* tauchte, in der sofort die Bildung von *Berliner Blau* stattfand. Bei den zu diesen Versuchen sehr geeigneten Bastzellen von Nerium oder Vinca war bei dieser Behandlungsweise auch nach dem Austrocknen und Einschluss in Cedernöl oder Canadabalsam die Streifung deutlich sichtbar.

Dass nun übrigens das Ferrocyankalium nur imbibiert, nicht aber *gespeichert* wird, konnte Correns (III, 295) in der Weise nachweisen, dass er in eine Lösung dieses Salzes trockene Stärkekörner eintrug und die Konzentration der Lösung vor und nachher untersuchte. Es stellte sich hierbei heraus, dass durch die Imbibition der Stärke keine merkliche Konzentrationsänderung hervorgebracht wurde. Ausserdem war übrigens bereits von Sachs nachgewiesen, dass in einem Fliesspapierstreifen das Ferrocyankalium mit derselben Geschwindigkeit wie das Wasser aufsteigt.

§ 297 n. Zur »*Versilberung*« benutzte Correns im wesentlichen, die schon seit längerer Zeit in der tierischen Anatomie üblichen Methoden. Er tauchte die auch in diesem Falle zuvor gut ausgetrockneten Objekte zunächst in eine 2—5% Lösung von Silbernitrat und dann nach oberflächlichem Abtrocknen, aber ohne sie auszuwaschen, in eine 0,75% Kochsalzlösung. Das hierdurch in den Membranen niedergeschlagene Silberchlorid wird dann am besten am Lichte reduziert, wozu bei direkter Besonnung einige Stunden ausreichen. Sodann werden die betreffenden Objekte ausgetrocknet und in Canadabalsam eingeschlossen. Man beobachtet dann in den wasserreichen Partien eine starke Schwärzung infolge des reduzierten Silbers, das zum teil auch kleine undurchsichtige Körnchen bildet. Als Versuchsobjekte sind hier ebenfalls die Bastzellen von Vinca und Nerium zu empfehlen, doch

werden dieselben zweckmässig vor dem Eintragen in die Silberlösung zur Entfernung reduzierender Substanzen einige Zeit mit Wasser ausgewaschen.

Uebrigens wird das Silbernitrat nach Correns (III, 296) in geringem Grade gespeichert; es trat nämlich einerseits eine geringe Aenderung in der Konzentration der Silberlösung durch die eingetragene Stärke ein, und andererseits blieb das Silbersalz auch im Fliesspapier etwas (um $^{3}/_{20}$) hinter dem Wasser zurück.

§ 297 o. III. *Die auf chemischen Verschiedenheiten beruhenden Membrandifferenzierungen* sind namentlich dadurch kenntlich, dass sie auch nach dem Austrocknen in der gleichen Weise zu beobachten sind, wie im imbibierten Zustande. Geeignete Versuchsobjekte für diese Kategorie von Membrandifferenzierungen bilden z. B. die grossen Markzellen von Podocarpus elongatus u. a. Species (cf. Zimmermann I, 149).

Zum Teil auf chemischen Differenzen, zum Teil auf ungleichem Wassergehalt beruht ferner nach Correns (II, 298) die sogenannte *Querlamellierung* der Bastzellen. Die chemische Verschiedenheit spricht sich hier übrigens auch darin aus, dass die radial verlaufenden stärker lichtbrechenden Lamellen in mässig konzentrierter *Methylenblaulösung* farblos bleiben, während die übrige Membransubstanz durch dieselbe intensiv gefärbt wird. Durch das Schulze'sche Mazerationsgemisch wird die stärkere Lichtbrechung zum Teil aufgehoben, offenbar durch Lösung der die stärkere Lichtbrechung bewirkenden Substanz; dem entsprechend werden auch die so behandelten Membranen durch Methylenblau in ihrer ganzen Ausdehnung gleichmässig gefärbt.

§ 297 p. Schliesslich sei an dieser Stelle die von Wiesner (V) in die botanische Mikroskopie eingeführte *Carbonisierungs-* oder *Zerstäubungsmethode* beschrieben. Durch dieselbe werden die vegetabilischen Zellmembranen zunächst in fadenförmige und dann in kugelförmige Körper zerlegt, die von dem genannten Autor als *Dermatosomen* bezeichnet werden, auf deren Bedeutung hier aber nicht näher eingegangen werden kann.

Als geeignete Versuchsobjekte für die Zerstäubungsmethode können z. B. Leinenfasern dienen. Dieselben werden nach Wiesner (III, 14) für 24 Stunden in 1% Salzsäurelösung gelegt, dann von der adhärierenden Flüssigkeit befreit und hierauf auf 50 bis 60° C. erwärmt, bis die Substanz völlig trocken geworden ist, was bei Anwendung kleiner Fasermengen schon nach 30—50

Minuten erreicht ist. Die Faser lässt sich dann durch leisen Druck in ein überaus feines Pulver zerlegen.

Bei anderen Objekten ist zum Teil ein längeres Verweilenlassen in Salzsäure oder die Anwendung höherer Temperaturen zum Trocknen notwendig. So gelang Wiesner bei den Endospermzellen von Phytelephas die Zerstäubung nur nach monatelanger Einwirkung von Salzsäure.

B. Der Plasmakörper und Zellsaft.

§ 298. Ueber die morphologischen Eigenschaften des Plasmakörpers hat man bisher abgesehen von der direkten Untersuchung des lebenden Materiales durch *mikrochemische Reaktionen* und durch *Tinktionsmethoden* Aufschluss zu erlangen gesucht. Obwohl es nun a priori wahrscheinlich erscheinen dürfte, dass hier die *Mikrochemie* in erster Linie zum Ziele führen müsste, hat dieselbe bisher die auf sie gestellten Erwartungen nicht bestätigt, was wohl in erster Linie darin seinen Grund haben dürfte, dass makrochemische Untersuchungen der fraglichen Körper, die ja natürlich bei der Kleinheit und leichten Zersetzlichkeit derselben mit den grössten Schwierigkeiten zu kämpfen haben, bisher nur in wenigen Fällen mit einiger Exaktheit durchgeführt werden konnten. Sodann ist aber auch noch gar nicht entschieden, ob die verschiedenen Organe des Plasmakörpers, wie z. B. die Nukleolen oder die Leukoplasten, immer aus den gleichen oder auch nur aus verwandten chemischen Verbindungen bestehen, wenn auch das Verhalten gegen verschiedene Farbstoffe diese Annahme für manche Fälle als wahrscheinlich erscheinen lässt; denn wir besitzen gewisse *Tinktionsmethoden*, die mit einer solchen Präzision eintreten, dass sie den besten mikrochemischen Reaktionen würdig an die Seite gestellt werden können und den Tinktionsmethoden bei der Untersuchung des Plasmakörpers zur Zeit unstreitig die erste Stelle sichern. Natürlich kann aber dadurch nicht in Frage gestellt werden, dass schon in allernächster Zeit die mikrochemischen Reaktionen für die Untersuchung des Plamakörpers von der grössten Bedeutung werden können.

Wir wollen nun im folgenden zunächst die Nachweisungsmethoden der verschiedenen plasmatischen Einschlüsse und Differenzierungen des Plasmakörpers besprechen und dann einige Methoden erörtern die beim Studium verschiedener allgemeiner Eigen-

schaften des Plasmakörpers und des Zellsaftes und einiger physiologischer Prozesse angewandt wurden.

1. Der Zellkern und seine Bestandteile.

§ 299. Die Fortschritte, welche unsere Kenntnisse von den morphologischen Eigenschaften des Zellkernes in den letzten Dezennien gemacht haben, sind fast ausschliesslich den Tinktionsmethoden zu verdanken, und so ist es denn auch erklärlich, dass man die verschiedenartigsten natürlichen und künstlichen Farbstoffe auf ihre Anwendbarkeit in dieser Hinsicht geprüft hat und dass eine wahre Unzahl von Tinktionsmethoden von ihren Erfindern auf das wärmste empfohlen wurde.

Es kann nun nicht meine Aufgabe sein, alle diese Methoden hier aufzuzählen, vielmehr glaube ich mich auf die besten derselben beschränken zu sollen, die einer allgemeineren Anwendung fähig sind und auch in schwierigeren Fällen nicht im Stiche lassen.

Ich beginne mit einer Aufzählung der wichtigsten Fixierungs- und Tinktionsmethoden, daran reihen sich dann einige allgemeine Bemerkungen über die Färbung des Kernes in den verschiedenen Zellen und über den Nachweis der verschiedenen Bestandteile desselben.

I. Allgemeines über die verschiedenen Methoden.

a. Fixierungsmethoden.

α) Alkohol C_2H_5OH.

§ 300. Zur Fixierung der Kerne genügt gewöhnlich eine Einwirkung von 24 Stunden, doch wirkt auch eine beliebig längere Einwirkung nicht schädlich.

Will man von dem Alkoholmaterial freihändig Schnitte anfertigen, so ist es vielfach zweckmässig, dieselben 24 Stunden vorher in ein Gemisch von gleichen Volumteilen *Alkohol* und *Glycerin* oder Alkohol, Glycerin und Wasser zu bringen, das sie viel geeigneter zum Schneiden macht.

Ueber den Zusatz von *schwefliger Säure* zu solchen Präparaten, die sich in reinem Alkohol schwärzen würden, vergl. § 34.

β) Jod.

§ 301. Jod wurde bisher namentlich in wässeriger Jodjodkaliumlösung zur Fixierung angewandt. Für Meeresalgen empfiehlt

Berthold (II, 704 Anm.) eine konzentrierte Lösung von Jod in Meerwasser, die durch Zusatz von einigen Tropfen alkoholischer Jodlösung zu reinem Meerwasser bereitet werden kann. Es genügt nach Berthold die Algen $^1/_2$—1 Minute in dieser Flüssigkeit umzuschwenken; sodann werden sie direkt in 50% Alkohol gebracht und können, wenn man die Flüssigkeit einige Male wechselt, schon nach wenigen Minuten in die Tinktionsflüssigkeit übertragen werden.

Von Overton (I, 530) wurden auch Joddämpfe, die man durch Erwärmung einiger Jod-Kryställchen in einem engen Reagenzgläschen leicht erhalten kann, zum Fixieren angewandt, dieselben haben den Vorteil, dass sie sich durch gelindes Erwärmen (auf 30—40°) vollständig verjagen lassen und somit kein Auswaschen des Fixierungsmittels notwendig machen. Die Anwendung derselben ist namentlich bei kleinen Objekten zu empfehlen (cf. § 40).

γ) Brom.

§ 302. Bromdämpfe werden von Strasburger (I, 399) zur Fixierung von Fucus empfohlen.

δ) Pikrinsäure $C_6H_2 . (NO_2)_3 . OH$.

§ 303. Pikrinsäure wird meist in konzentrierter wässeriger oder alkoholischer Lösung angewandt. Eine Einwirkung von 24 Stunden dürfte wohl im allgemeinen ausreichen. Vor dem Färben muss sie sehr sorgfältig ausgewaschen werden, wozu man sich zweckmässig fliessenden Wassers bedient (cf. § 35). In manchen Fällen empfiehlt es sich auch, zum Auswaschen Alkohol zu benutzen, in dem die Pikrinsäure leichter löslich ist, als in Wasser.

ε) Pikrinschwefelsäure.

§ 304. Die Pikrinschwefelsäure wird zweckmässig nach dem von Mayer vorgeschlagenen Rezepte in der Weise bereitet, dass man 100 Volume Wasser und 2 Volume konzentrierter Schwefelsäure mischt, dann soviel Pikrinsäure zuschüttet als sich löst und schliesslich mit dem dreifachen Volum Wasser verdünnt. Die Pikrinschwefelsäure hat der reinen Pikrinsäure gegenüber den Vorteil, dass sie sich leichter auswaschen lässt und wurde namentlich bei niederen Organismen vielfach angewandt.

ζ) Chromsäure CrO_3.

§ 305. Chromsäure wurde bisher namentlich in 1 % wässeriger Lösung mit bestem Erfolg zur Fixierung von **Algen** angewandt.

Es genügt hier wohl stets eine Einwirkung von einigen Stunden, bei grösseren Pflanzenteilen wird man das Fixierungsmittel aber wohl besser ca. 24 Stunden einwirken lassen. Vor dem Färben muss die Chromsäure stets gut ausgewaschen werden, wozu man zweckmässig fliessendes Wasser benutzen kann (cf. § 35). Overton (I, 10) empfiehlt zu diesem Zwecke eine schwache wässerige Lösung von *schwefliger Säure;* diese soll die mit Chromsäure fixierten Objekte in wenigen Minuten für Haematoxylin und Karmin tinktionsfähig machen.

Die Chromsäure hat den Nachteil, dass sie namentlich in gerbstoffreichen Geweben häufig die Entstehung von die Beobachtung störenden Fällungen bewirkt.

§ 306. Es mag schliesslich noch hervorgehoben werden, dass nach Virchow (I) mit Chromsäure fixierte Objekte vor der vollständigen Entfernung der Chromsäure mit *Alkohol* nur im Dunkeln zusammengebracht werden dürfen, weil am Lichte durch Niederschlagbildung die Tinktionsfähigkeit beeinträchtigt wird. Auch in dem zum Auswaschen verwandten Alkohol entsteht am Licht ein Niederschlag; die von diesem abfiltrierte Flüssigkeit kann aber wieder zum Auswaschen verwandt werden.

η) Chromameisensäure.

§ 307. Von Rabl (I, 215) wird ein Gemisch von 200 gr 1/8 % Chromsäure und 4—5 Tropfen konzentrierter Ameisensäure zur Fixierung von Kernteilungsfiguren empfohlen. Dasselbe muss jedesmal vor dem Gebrauch frisch bereitet werden und soll 12 bis 24 Stunden einwirken. Vor der Färbung muss es gut mit Wasser ausgewaschen werden.

ϑ) Osmiumsäure OsO_4.

§ 308. Um Schnitte oder kleine Objekte zu fixieren, verwendet man am zweckmässigsten Osmiumsäuredämpfe und bringt dieselben in einem an einem Deckgläschen oder Objektträger hängenden Wassertropfen über die Mündung einer 1 oder 2 % Os-

miumsäure enthaltenden Flasche. Die Tödtung und Fixierung geschieht so fast momentan. Zur Fixierung grösserer Pflanzenteile verwendet man zweckmässig 1 % Osmiumsäure und lässt dieselbe ohne Schaden mehrere Stunden einwirken.

Die Osmiumsäure, die unstreitig eines der besten Fixierungsmittel darstellt, hat den Nachteil, dass sie mit den verschiedenartigsten Stoffen braune bis schwarze Fällungen bildet. In den meisten Fällen lassen sich nun aber diese Fällungen nachträglich ohne Beeinträchtigung der plasmatischen Strukturen wieder entfernen, und zwar dürfte sich hierzu wohl *Wasserstoffsuperoxyd* am besten eignen. Overton (I, 11) empfiehlt zu diesem Zwecke ein Gemisch von 1 Teil käuflichem Wasserstoffsuperoxyd und 10—25 Teilen 70—80 % Alkohol anzuwenden. Uebrigens beobachtete ich, dass bei Mikrotomschnitten selbst nach Anwendung der konzentrierten käuflichen Wasserstoffsuperoxydlösung, die namentlich bei gelindem Erwärmen sofort entfärbt, die karyokinetischen Figuren vollkommen scharf und unverändert geblieben waren.

ι) Chromosmiumessigsäure.

§ 309. Gemische von Chromsäure, Osmiumsäure und Essigsäure sind namentlich von Flemming mit bestem Erfolg bei den Untersuchungen der karyokinetischen Figuren angewandt. Der genannte Autor hat übrigens sehr verschiedene Konzentrationen benutzt; es mögen hier folgende Gemische erwähnt werden, die sich beide auch bei Pflanzenzellen sehr gut bewährt haben. Das erstere *verdünntere Gemisch* enthält in Wasser 0,25 % Chromsäure, 0,1 % Osmiumsäure und 0,1 % Essigsäure; das *konzentriertere Gemisch* wird bereitet durch Vermischen von 15 Volumen 1 % Chromsäure, 4 Volumen 2 % Osmiumsäure und 1 Volum (oder weniger) Eisessig.

Beide Gemische müssen sorgfältig mit Wasser ausgewaschen werden; von der Osmiumsäure herrührende Schwärzungen werden zweckmässig durch Wasserstoffsuperoxyd entfernt (cf. § 308).

Zur Konservierung von Objekten, die mit dem genannten Säuregemisch fixiert sind, empfiehlt Flemming (III, 687, Anm.) ein Gemisch von Wasser, Alkohol und Glycerin ungefähr zu gleichen Teilen. Dasselbe soll die Tinktionsfähigkeit weniger beeinträchtigen als reiner Alkohol.

κ) Sublimat $HgCl_2$.

§ 310. Sublimat wird wohl meist am zweckmässigsten in konzentrierter alkoholischer Lösung angewandt, auch die konzentrierte wässerige Lösung leistet vielfach sehr gute Dienste. Es genügt zur vollständigen Fixierung wohl stets eine Einwirkung von wenigen Stunden, doch kann man dasselbe jedenfalls auch ohne Schaden 24 Stunden auf den betreffenden Objekten belassen. Zum Auswaschen des Sublimats benutzt man zweckmässig Alkohol, der mit etwas Jod versetzt ist, so dass die Lösung dunkel braun erscheint. War das Sublimat nicht völlig ausgewaschen, so beobachtet man im Präparat nadelförmige oder sphaeritenartige Sublimatkrystalle, die den Anfänger leicht täuschen können. Uebrigens kann man bei Objekten, aus denen das Sublimat vor dem Einbetten in Paraffin nicht völlig entfernt war, dasselbe auch nachträglich noch aus den Mikrotomschnitten mit Jodalkohol ausziehen.

Will man beim Auswaschen des Sublimats Alkohol vermeiden, so kann man sich zweckmässig des von Haug (I, 13) vorgeschlagenen Gemisches von 2 Teilen Jodtinktur 1 Teil Jodkalium, 50 Teilen Glycerin und 50 Teilen Wasser bedienen. Dasselbe wird solange erneuert, bis keine Entfärbung mehr stattfindet.

Hervorheben will ich noch, dass man die mit Sublimat fixierten Objekte vor dem völligen Auswaschen des Sublimats nicht mit eisernen Pinzetten oder dergl. berühren darf, da hierdurch auch innerhalb der betreffenden Objekte sehr leicht Quecksilberkugeln entstehen würden. Man benutzt in diesem Falle zweckmässig Pinzetten mit Platin- oder Hornspitzen.

λ) Platinchlorid $PtCl_4$.

§ 311. Eine $^1/_3$% wässerige Lösung von Platinchlorid wurde von Rabl (I, 216) zur Fixierung der Kernteilungsfiguren empfohlen. Bei Anwendung derselben sollen namentlich die Längsspaltung der Fadensegmente und die Chromatinkugeln gut hervortreten. Die Dauer der Einwirkung betrug im allgemeinen 24 Stunden.

μ) Chromsäure-Platinchlorid.

§ 312. Von Merkel wurde folgende Zusammensetzung angewandt: 100 Volume 1% Chromsäure, 100 Volume 1% Platin-

chloridlösung und 600 Volumen Wasser. Dies Fixierungsmittel leistete auch bei pflanzlichen Objekten sehr gute Dienste. Dauer der Einwirkung 24 Stunden.

ν) Platinchlorid-Osmium-Essigsäure.

§ 313. Von F. Hermann (I, 59) wird folgende Mischung empfohlen: 15 Volume 1% Platinchlorid, 1 Volum Eisessig und 2 oder 4 Volume 2% Osmiumsäure. Hermann lässt dies Gemisch 1—2 Tage einwirken. Zur Darstellung der achromatischen Kernfigur wäscht er es sodann in fliessendem Wasser aus, härtet in Alkohol von steigender Konzentration nach und legt hierauf die Objekte 12—18 Stunden in rohen *Holzessig* (cf. Hermann, II, 571).

b. Tinktionsmethoden.

α) Haematoxylin.

§ 314. Neben dem Carmin wurde wohl Haematoxylin am meisten zur Färbung der Zellkerne angewandt, und es giebt auch eine ganze Unzahl von Vorschriften zur Bereitung besonders wirksamer Haematoxylinlösungen. In den meisten Fällen scheint mir nun unter diesen die sogenannte Delafield'*sche Haematoxylinlösung,* die vielfach auch fälschlich Grenacher'*sches Haematoxylin* genannt wird, den Vorzug zu verdienen. Dieselbe wird in folgender Weise dargestellt: zunächst werden 4 gr Haematoxylin in 25 ccm Alkohol gelöst, dann werden 400 ccm einer konzentrierten wässerigen Lösung von Ammonalaun hinzugefügt und das Gemisch 3—4 Tage am Lichte stehen gelassen, filtriert, 100 ccm Glycerin und 100 ccm Methylalkohol zugesetzt, wieder einige Tage stehengelassen und nochmals filtriert. Da die Darstellungsweise somit eine etwas komplizierte ist, wird man wohl im allgemeinen vorziehen, dasselbe fertig aus einer Chemikalienhandlung zu beziehen (z. B. von Dr. G. Grübler, Leipzig).

§ 315. Sehr brauchbar ist ferner auch das sogenannte Böhmer'sche *Haematoxylin.* Dasselbe wird in der Weise bereitet, dass man von einer konzentrierten alkoholischen Haematoxylinlösung, die 0,35 gr Haematoxylin auf 10 gr Alkohol enthält und unbegrenzt haltbar ist, einige Tropfen zu einer Lösung von Alaun zusetzt, die auf 30 gr Wasser 0,10 gr Alaun enthält. Dies Ge-

misch lässt man dann einige Tage stehen und filtriert es vor dem Gebrauch.

Bezüglich der übrigen Haematoxylinlösungen, die in speziellen Fällen ebenfalls vorzügliches leisten mögen und zum Teil ebenfalls im gebrauchsfertigen Zustande aus den verschiedenen Chemikalienhandlungen bezogen werden können, sei namentlich auf die Zusammenstellung von Gierke (I, 32—35) verwiesen.

§ 316. Will man nun Schnitte mit Haematoxylin tingieren, so bringt man dieselben im allgemeinen am besten in eine sehr verdünnte Lösung und lässt sie längere Zeit (1—24 Stunden) in derselben. Bei Alkohol-Material ist es anzuempfehlen, dasselbe vor der Uebertragung in die Farblösung für kurze Zeit in Wasser zu bringen, da sonst leicht Niederschläge entstehen.

Meist wird man auch schön differenzierte Färbungen erhalten, wenn man die Schnitte zu stark färbt (»*überfärbt*«) und dann mit einer geeigneten Flüssigkeit auswäscht. Bei der Färbung mit Haematoxylin ist hierzu vielfach Alaunlösung (etwa 2%) sehr geeignet, dieselbe muss dann aber stets vor der Uebertragung in Alkohol, resp. Canadabalsam wieder vollständig ausgewaschen werden, da sich sonst Alaunkrystalle im Präparat niederschlagen würden.

Ausserdem wurde zum Auswaschen des Haematoxylins auch *Säurealkohol* empfohlen; doch muss dann die Säure vor dem definitiven Einschluss stets wieder durch reinen Alkohol vollständig entfernt werden.

Sehr gute Kernfärbung erhält man vielfach auch, wenn man die mit Haematoxylin stark tingierten Objekte nachträglich für eine kurze Zeit in eine 1% Lösung von *Kaliumbichromat* oder eine konzentrierte wässerige *Pikrinsäurelösung* bringt. Beide Flüssigkeiten müssen natürlich vor der Uebertragung in Canadabalsam oder Glyceringelatine ebenfalls sorgfältig ausgewaschen werden.

§ 317. Handelt es sich um Objekte, die man mit dem Mikrotom schneiden will, so wird man meist sehr reine Kernfärbungen erhalten, wenn man dieselben vor dem Einbetten in Paraffin in toto färbt (»durchfärbt«). Da das Haematoxylin die Cuticula nicht zu durchdringen vermag und somit nur von der Schnittfläche aus vordringt, erhält man hier meist auf ein und demselben Schnitte sehr verschiedene Färbungsintensitäten und in einiger Entfernung von der ursprünglichen Schnittfläche der fixierten Objekte reine Kernfärbung. Grössere Objekte muss man übrigens,

um eine genügende Durchfärbung zu erhalten, häufig ziemlich lange Zeit (oft mehrere Tage) in der Farblösung, die man auch in diesem Falle am besten ziemlich verdünnt anwendet, belassen. Sehr gute Durchfärbung soll man auch erhalten, wenn man grössere Stücke zunächst intensiv mit Haematoxylinlösung tingiert und dann für längere Zeit in 1% Kaliumbichromatlösung bringt.

β) Carmin.

§ 318. Von den zahllosen verschiedenen Carminlösungen können hier nur einige wenige ausführlich besprochen werden. Uebrigens können dieselben, wie auch verschiedene andere carminhaltige Tinktionsmittel, im gebrauchsfertigen Zustande aus den meisten Chemikalienhandlungen bezogen werden.

1. *Borax-Carmin* nach Grenacher kann bereitet werden, indem man 4 gr Borax und 2—3 gr Carmin in 93 ccm Wasser löst, dann 100 ccm 70% Alkohol zusetzt, schüttelt und filtriert. Diese Lösung wird auch zum Durchfärben angewandt. Zum Auswaschen wird Säurealkohol und eine Lösung von Borax oder Oxalsäure in Weingeist empfohlen.

2. Beale's *Carmin.* 0,6 gr Carmin werden mit 3,75 gr Liq. Ammon. caust. geschüttelt, dann einige Minuten gekocht und nach einer Stunde 60 gr Glycerin, 60 gr Wasser und 15 gr Alkohol zugesetzt und schliesslich filtriert.

3. *Carminsaures Ammon.* Dasselbe stellt man sich wohl am besten in der Weise dar, dass man das käufliche trockene carminsaure Ammon (sogenanntes Hoyer'sches carminsaures Ammon) in Wasser löst, dem etwas (etwa 0,5%) Ammoniumcarbonat zugesetzt ist. Zum Auswaschen desselben benutzt man am besten Alkohol oder Säurealkohol.

4. *Carminsaures Natron* kann ebenfalls direkt im festen Zustande bezogen werden und wird zweckmässig in einer wässerigen 0,5% Lösung von Ammoniumcarbonat aufgelöst.

5. *Carminlösung nach* P. Mayer. Zur Darstellung derselben werden 4 gr Carmin in 15 ccm Wasser verrieben, dann 30 Tropfen Salzsäure unter Erwärmen hinzugefügt, darauf 95 ccm 85% Alkohol zugesetzt, aufgekocht, mit Ammoniak neutralisiert und nach dem Erkalten filtriert. Wird ebenfalls zur Färbung von Schnitten und zum Durchfärben verwandt.

6. *Essigsaures Carmin.* Carminsaures Ammon wird mit Essigsäure in möglichst geringem Ueberschuss tropfenweise versetzt,

bis die kirschrote Flüssigkeit ziegelrot geworden, dann wird filtriert. Zum Auswaschen wird ein Gemisch von 1 Teil Salzsäure und 200 Teilen Glycerin oder 1 Teil Ameisensäure und 100 Teilen Glycerin empfohlen.

7. *Pikrocarmin.* Als Pikrocarmin bezeichnet man Gemische von *Pikrinsäure* und Carmin, die sehr verschiedenartig zusammengesetzt sein können. Ich will hier nur das einfachste von Hoyer herrührende Rezept anführen; nach diesem wird Carminpulver in einer konzentrierten Lösung von neutralem pikrinsauren Ammon gelöst.

§ 319. Alle diese Carminsolutionen sind nun sowohl zum Färben von Schnitten, als auch zum Durchfärben geeignet. Im allgemeinen dringen sie aber nur ziemlich langsam ein und erfordern eine ziemlich lange Zeit. An Schärfe der Tinktion stehen sie wohl vielen anderen Farbstoffen in den meisten Fällen nach, dagegen geben sie meist eine sehr reine Kernfärbung, namentlich wird die Zellmembran durch Carmin selten tingiert.

γ) Safranin.

§ 320. Zur Färbung mit Safranin benutzt man am zweckmässigsten das von Zwaardemaker (I) empfohlene *Anilinwasser-Safranin,* das durch Vermischen von gleichen Volumteilen konzentrierter alkoholischer Safraninlösung und Anilinwasser[1]) dargestellt werden kann. Diese Lösung lässt man eine Stunde oder beliebig länger einwirken. Das Auswaschen geschieht zweckmässig mit Alkohol oder Säurealkohol, d. h. Alkohol, der etwa 0,5 % Salzsäure enthält.

δ) Gentianaviolett (Gram'sche Methode).

§ 321. Die von Gram ursprünglich zur isolierten Färbung der Bakterien vorgeschlagene Methode (cf. § 470) ist in manchen Fällen, namentlich bei Material, das mit einem der in § 309, 312 und 313 vorgeschlagenen Säuregemische fixiert ist, auch zur Färbung der Kerne sehr geeignet. Als Färbeflüssigkeit benutzt man in diesem Falle zweckmässig ein Gemisch von 3 gr Anilin, 1 gr Gentianaviolett, 15 gr Alkohol und 100 gr Wasser; in diesem verweilen die Schnitte eine oder wenige Minuten, dann wird die

1) Dieselbe wird durch Schütteln von Wasser mit überschüssigem Anilin dargestellt und enthält ca. 3,5 % Anilin.

Farblösung mit Alkohol abgespült und sofort eine Lösung von 1 Teil Jod und 2 Teilen Jodkalium in 300 Teilen Wasser zugesetzt, die den Schnitten eine dunkle Farbe verleiht, dann wird wieder mit Alkohol ausgewaschen, dann Nelkenöl zugesetzt, das noch weiteren Farbstoff den Schnitten entzieht und häufig erst die eigentlich differenzierende Färbung hervorruft, und schliesslich in Canadabalsam eingeschlossen.

Besonders hervorheben will ich an dieser Stelle noch, dass bei dieser Methode das Nelkenöl keineswegs, wie mehrfach angegeben wird, nur aufhellend wirkt; ersetzt man dasselbe z. B. durch Xylol, so wird man auch bei starkem Auswaschen mit Alkohol in vielen Fällen nicht annähernd so reine Kernfärbungen erhalten, als bei Anwendung von Nelkenöl.

Schliesslich sei gleich an dieser Stelle noch hervorgehoben, dass man eine sehr gute Doppelfärbung erhalten kann, wenn man in dem zum Auswaschen benutzten Nelkenöl etwas *Eosin* löst. Es erscheinen dann die Membranen und die achromatische Kernfigur rein rot, die chromatische Kernfigur violett.

ε) Safranin und Gentianaviolett.

§ 322. Nach der von Hermann (I, 60) empfohlenen Methode kommen die Schnitte zuerst auf 24—48 Stunden in eine Safraninlösung, die auf 1,0 gr Farbstoff, 10,0 ccm Alkohol und 90,0 ccm Anilinwasser enthält. Sodann werden sie successive mit Wasser, Säurealkohol und Alkohol behandelt, doch so, dass sie zur direkten Beobachtung noch zu intensiv gefärbt sein würden. Aus dem Alkohol kommen die Schnitte dann für 3 bis 5 Minuten in eine Lösung von Gentianaviolett, die ebenfalls auf 1 gr Farbstoff 10 ccm Alkohol und 90 ccm Anilinwasser enthält; sie werden dann in Alkohol flüchtig abgespült und darauf wie bei der Gram'schen Methode in Jodjodkalilösung (1,0 Teil J, 2,0 Teile JK, 300 Teile H_2O) gebracht, in der sie 1—3 Stunden verbleiben, bis sie vollständig schwarz geworden sind; dann werden die Schnitte in Alkohol differenziert, in Xylol aufgehellt und in Canadabalsam eingeschlossen.

Bei gut gelungenen Präparaten sind in den ruhenden Kernen die Nukleolen grell rot, das Kerngerüst blauviolett. Von den karyokinetischen Figuren sind das Spirem und Dispirem ebenfalls blau, die zwischenliegenden Stadien aber rot gefärbt. Die achromatische Figur erscheint durch das Jod leicht gelbbraun gefärbt.

ζ) Safranin-Gentianaviolett-Orange.

§ 323. Nach Flemming (III, 685 Anm.) ist es am zweckmässigsten die mit Chromosmiumessigsäure (cf. § 309) oder der Hermann'schen Platinchloridosmiumessigsäure (cf. § 313) fixierten Objekte 2—3 Tage in eine konzentrierte alkoholische Lösung von Safranin, die ungefähr mit dem gleichen Quantum Wasser und etwas Anilinwasser versetzt ist, zu bringen; dann werden sie mit Wasser abgewaschen und darauf mit Alkohol, dem höchstens 0,1 % Salzsäure zugesetzt ist, oder auch in reinem Alkohol ausgezogen, bis sich wenig mehr löst. Nach kurzem Waschen mit Wasser kommen dann die Objekte auf 1—3 Stunden in eine konzentrierte wässerige Lösung von Gentianaviolett und dann wieder nach kurzem Waschen in Wasser in eine konzentrierte wässerige Lösung von Orange [1]), in der sich die dunkle Farbe allmählich aus ihnen löst. Nach wenigen Minuten, während noch blaue Farbwolken herausgehen, werden die Schnitte dann in absoluten neutralen Alkohol gebracht, nach wiederholter Erneuerung desselben in Nelken- oder Bergamottöl, die noch leichte Farbwolken herauslösen, übertragen und schliesslich in Balsam eingeschlossen. Das Schwierige bei dieser Methode besteht darin, den Moment richtig abzupassen, in dem die Schnitte in Alkohol und Oel weder zu stark noch zu wenig ausgewaschen sind.

Bei gut gelungenen Präparaten sollen das Chromatin purpurrot, die achromatischen Spindelfasern graubraun, grau oder violett, die Centralkörper (cf. § 348a) ebenso oder leicht rötlich gefärbt sein.

§ 324. Ich habe nun diese beiden letzten Methoden bei Wurzelspitzen von Vicia Faba und verschiedenen anderen pflanzlichen Objekten erprobt und kann dieselbe auch zur Färbung pflanzlicher Kerne nur bestens empfehlen. Die instruktivsten Bilder erhielt ich jedoch, wenn ich die Schnitte — ich operierte mit Mikrotomschnitten — nur ½ oder höchstens 2 Stunden in dem Hermann'schen Anilinwasser-Safranin beliess; ich wusch dasselbe dann succesive mit Säurealkohol und Alkohol aus, setzte Anilinwasser-Gentianaviolett zu, das ich höchstens 2—4 Minuten auf den Schnitten beliess, spülte dann den Farbstoff mit Wasser ab, tauchte für 5 Minuten oder beliebig länger in die Gram'sche

1) Dasselbe ist unter der Bezeichnung Orange G von Dr. Grübler zu beziehen.

Jodjodkaliumlösung und wusch dann entweder mit Alkohol oder successive mit Alkohol und Nelkenöl aus und übertrug in Canadabalsam, oder ich färbte noch nachträglich mit Orange. In diesem Falle spülte ich die Schnitte, nachdem sie aus der Gentianaviolettlösung kamen nur ganz kurze Zeit mit Alkohol ab, brachte sie dann in eine konzentrierte wässerige Lösung von Orange, die ich einige Minuten einwirken liess, wusch dann mit Alkohol aus und übertrug in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam.

Bei gut gelungenen Präparaten waren bei der Färbung mit Orange die Nukleolen und die karyokinetischen Figuren vom Aster bis zum Dyaster intensiv rot, das Kerngerüst der ruhenden Kerne und das Spirem und Dispirem violett bis blau, die achromatische Kernfigur und das Cytoplasma gelbbraun gefärbt.

η) Fuchsin.

§ 325. Die Schnitte werden zunächst für 15 Minuten oder beliebig länger in eine konzentrierte wässerige Lösung von Fuchsin getaucht, dann mit konzentrierter Lösung von Pikrinsäure in zwei Teilen Wasser und 1 Teil Alkohol übergossen, in dem die Färbung dunkelviolett wird, dann so lange mit 90% Alkohol gewaschen, bis sie keine Farbe mehr abgeben, darauf schnell mit absolutem Alkohol abgespült, in Xylol übertragen und schliesslich in Canada-Balsam eingeschlossen. Man erhält so eine sehr intensive Kernfärbung.

Man kann diese Färbung übrigens auch mit *Methylblau* kombinieren und zwar in der Weise, dass man nach dem Auswaschen der Pikrinsäure durch Alkohol die Schnitte für ca. 1/4 Stunde in eine wässerige Lösung von Methylblau bringt, diese dann abwäscht und in der gewöhnlichen Weise in Canada-Balsam einschliesst.

ϑ) Fuchsin-Methylgrün.

§ 326. Guignard (I, 19) empfiehlt zur Kernfärbung eine wässerige Lösung von Fuchsin und Methylgrün, die soviel von diesen beiden Farbstoffen enthält, dass sie tief violett erscheint. Diese Lösung wird zweckmässig ganz schwach mit Essigsäure angesäuert. Sie färbt sehr schnell den Kern blaugrün, das Protoplasma lebhaft rot. Bei Ueberfärbung wird mit Wasser ausgewaschen.

ι) Fuchsin-Jodgrün.

§ 327. Sehr geeignet für pflanzliche Objekte ist nach Strasburger (I, 575) ein von Babes vorgeschlagenes Gemisch von Fuchsin und Jodgrün. Man stellt dasselbe in der Weise her, dass man eine Lösung von Jodgrün in 50 % Alkohol in eine Schale giesst und so lange Fuchsin, das ebenfalls in 50 % Alkohol gelöst ist, zusetzt, bis die Flüssigkeit eine ausgeprägt violette Färbung angenommen hat. Die zu färbenden Schnitte bleiben in dieser Lösung ca. 1 Minute und werden dann in Glycerin übertragen.

c. Gleichzeitige Fixierung und Färbung.

α) Methylgrün-Essigsäure.

§ 328. Um bei lebenden Objekten eine schnelle Färbung der Kerne zu erhalten, kann man vielfach die namentlich von Strasburger empfohlene Lösung von Methylgrün in 1 % Essigsäure mit gutem Erfolg anwenden. Man muss dann aber meist sehr farbstoffarme Lösungen anwenden. Die Beobachtung kann entweder in der Farbflüssigkeit selbst oder in Glycerin geschehen. Eine Konservierung der mit Methylgrün gefärbten Präparate ist nicht möglich.

β) Nigrosin-Pikrinsäure.

§ 329. Namentlich bei Algen kann mit gutem Erfolge die von Pfitzer (I) empfohlene Lösung von Nigrosin in konzentrierter wässeriger Pikrinsäurelösung zur gleichzeitigen Fixierung und Tinktion verwandt werden. Um zugleich auch das Chlorophyll auszuziehen, kann man auch eine Lösung von Nigrosin und Pikrinsäure in 96% Alkohol anwenden. Zu einer guten Tinktion sind übrigens meist mindestens 24 Stunden erforderlich; die Präparate werden sodann in Glycerin ausgewaschen und können in Glyceringelatine konserviert werden. Noch schöner treten die Farben allerdings nach der Uebertragung in Canadabalsam oder dergl. hervor. In beiden Einschlussmassen ist die Färbung gut haltbar.

d. Lebendfärbung.

§ 330. Die Färbung lebender Kerne wurde bei höheren Pflanzen zuerst von Campbell (I) ausgeführt, und zwar gelang

dieselbe mit *Dahlia, Methylviolett* und *Mauveïn.* Der genannte Autor brachte Stücke von den zu untersuchenden Objekten im allgemeinen in eine 0,001—0,002 % Lösung eines dieser Farbstoffe und beliess sie meist mehrere Stunden innerhalb derselben. Als besonders geeignete Versuchsobjekte werden die Staubfädenhaare von Tradescantia virginica empfohlen, bei denen es Campbell auch gelang, die in Teilung begriffenen Kerne lebend zu färben. Uebrigens sind diese Färbungen meist nur ziemlich schwach und stets viel weniger differenziert als die guten Färbungen fixierter Kerne; so hat denn auch die Lebendfärbung bisher nicht zu irgendwelchen für die Morphologie des Kernes wichtigen Ergebnissen geführt.

II. Spezielles über den ruhenden Kern und seine Bestandteile.

a. Nachweis des ruhenden Kernes.

§ 331. Handelt es sich zunächst einfach um den Nachweis *ruhender Kerne* in einem Organe oder einem Gewebesysteme, so dürfte dies bei den *Phanerogamen,* sowie bei den *Pteridophyten* und *Moosen* in keinem Falle mehr erhebliche Schwierigkeiten machen. Namentlich bei der Fixierung mit Chrom-Osmium-Essigsäure (§ 309) oder Chromsäure-Platinchlorid (§ 312) und Färbung nach einer der in § 320—325 angeführten Methoden, wird man wohl stets sicher und ohne grosse Mühe zum Ziele gelangen. Auch beim Durchfärben mit Haematoxylin (§ 314) erhielt ich in einiger Entfernung von der Schnittfläche stets sehr scharfe Kernfärbung. Ebenso erhält man unter Anwendung der oben aufgeführten Methoden auch bei *Algen* und *Pilzen* meist sehr instruktive Präparate. Für die meisten Algen bildet ausserdem namentlich auch 1 % Chromsäure (cf. § 305) eine geeignete Fixierungsflüssigkeit, auch mit der Nigrosin-Pikrinsäure Methode (§ 329) wurden vielfach sehr gute Färbungen erzielt.

§ 332. Um in den *stärkereichen* Eizellen von Nitella den Kern zu färben, verwandte Overton (II, 35) ein Gemisch von *gelbem Blutlaugensalz* und mit der 8—10fachen Wassermenge verdünnter Salzsäure. Es wird dann durch die Salzsäure die Stärke verzuckert und gleichzeitig durch das durch Zersetzung des gelben Blutlaugensalzes entstehende *Berliner Blau* der Kern gefärbt. Zur Aufhellung empfiehlt der genannte Autor Chloralhydrat.

§ 333. Besondere Schwierigkeiten werden häufig durch die mit *cuticularisierten und schwer permeabelen Membranen* versehenen Fortpflanzungsorgane oder dergl. verursacht. Hier wird jedenfalls die nachträgliche Färbung von Mikrotomschnitten die besten Dienste zu leisten im Stande sein.

§ 334. Handelt es sich in schwierigeren Fällen, wie z. B. bei der Verfolgung der Entwickelungsgeschichte der Spermatozoen, um eine besonders *scharfe Abgrenzung der Kerne gegen das Cytoplasma,* so kann man Doppelfärbungen mit gutem Erfolg anwenden. Von Guignard (I) wurde zu dem obengenannten Zwecke bei dem mit Osmiumsäure oder Alkohol fixierten Materiale die Färbung mit *Fuchsin* und *Methylgrün* (cf. § 326) angewandt.

b. Die Bestandteile des ruhenden Kernes.

§ 335. Gehen wir nun näher auf die verschiedenen Bestandteile des Kernes ein, so stellt der *Nucleolus* bei den meisten Kernfärbungsmethoden den am stärksten tinktionsfähigen Teil des Kernes dar. Bei vielen Objekten erscheinen bei Anwendung der obengenannten Methoden bei stärkerem Auswaschen innerhalb der ruhenden Kerne überhaupt nur die Nukleolen intensiv gefärbt. Auf der anderen Seite sind jedoch auch die sogenannten *Chromatinkugeln* des *Kerngerüstes* im ruhenden Kerne durch starke Tinktionsfähigkeit ausgezeichnet, und es herrschen in dieser Beziehung innerhalb der verschiedenen Pflanzen und Pflanzenteile, sowie zwischen den verschiedenen Altersstadien gleichartiger Zellen grosse Verschiedenheiten, so dass es sogar häufig gelingt, mit der gleichen Methode in den jüngeren Teilen nur die Nukleolen und in älteren nur das Kerngerüst zu färben. Worauf diese Verschiedenheiten beruhen, lässt sich zur Zeit noch nicht angeben. Immerhin ist jedoch nicht unwahrscheinlich, dass im sogenannten Kerngerüst noch verschiedenartige Körper enthalten sind.

§ 336. Die sicherste Unterscheidung zwischen Chromatinkugeln und Nukleolen ist wohl zur Zeit mit Hilfe der Hermann-Flemming'schen Safranin-Gentianaviolett-Methoden (cf. § 322—324) zu erlangen, die namentlich bei der Fixierung mit Chromosmiumessigsäure (§ 309) oder Platinchloridosmiumessigsäure (§ 313) eine schön rote Färbung der Nukleolen und eine violettblaue der Chromatinkugeln bewirken. Ob nun übrigens diese Methoden für alle Fälle so scharfe Bilder geben, muss noch durch weitere Untersuchungen festgestellt werden.

§ 337. In manchen Fällen wird man übrigens wohl zum Nachweis der Chromatinkugeln mit Vorteil *Verdauungsflüssigkeiten* anwenden können. Dieselben werden nämlich durch Pepsin nicht angegriffen, während sie vom Trypsin schnell aufgelöst werden (cf. § 232—234).

§ 338. Erwähnen will ich schliesslich noch an dieser Stelle, dass von Altmann (III) eine Granulastruktur im ruhenden Kern beobachtet wurde, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden kann, da dieser Autor die angewandten Methoden noch nicht publiziert hat.

§ 339. In geringem Grade tinktionsfähig ist auch die *Kernmembran.* Nach Fr. Schwarz (I, 123) soll dieselbe am besten sichtbar gemacht werden können durch 20% Lösung von Kochsalz oder Monokaliumsulfat, oder durch eine konzentrierte Lösung von Kaliumbichromat oder das § 238 erwähnte Gemisch von Ferrocyankalium und Essigsäure.

III. Die Kernteilungsfiguren.

§ 340. Bei den in indirekter oder karyokinetischer Teilung begriffenen Kernen unterscheidet man bekanntlich eine *chromatische* und eine *achromatische Figur.* Die erstere besteht im allgemeinen aus einem aus an einander gereihten Kugeln oder Scheiben (*Chromatinkugeln*) zusammengesetzten Faden (*Kernfaden*), der zunächst in eine Anzahl von Segmenten zerfällt, von denen jedes längs gespalten wird. Die so entstandenen Segmenthälften weichen dann derartig auseinander, dass in jeden Tochterkern eine derselben gelangt. Die achromatische Kernfigur besteht dagegen aus einer Anzahl sehr zarter Fäden, die meist spindelförmig angeordnet sind, so dass man sie wohl auch als *Kernspindel* bezeichnet (cf. Fig. 36).

§ 341. Die *chromatische Kernfigur* ist nun, wie schon der Name sagt, durch starke Tinktionsfähigkeit ausgezeichnet, sie wird auch meist viel intensiver gefärbt als das Kerngerüst der ruhenden Kerne und stimmt in ihrem Verhalten gegen Tinktionsmittel im allgemeinen mehr mit den Nukleolen überein, obwohl sie aus diesen jedenfalls nicht hervorgeht.

So erhält man z. B. in den meisten Fällen eine sehr intensive Färbung der chromatischen Kernteilungsfigur bei der Fixierung mit dem konzentrierten Flemming'schen Chromosmium-

essigsäuregemisch (cf. § 309) und Färbung mit Anilinwasser-Safranin (cf. 320). Es sind dann schon bei schwacher Vergrösserung die in karyokinetischer Teilung begriffenen Kerne infolge ihrer intensiveren Färbung von den ruhenden Kernen leicht zu unterscheiden. Ausserdem ist übrigens namentlich auch Chromsäure-Platinchlorid (cf. § 312) und Chromameisensäure (cf. § 307) zur Fixierung und die Gram'sche (cf. § 321), sowie die Fuchsin-Pikrinsäure-Methode (cf. § 325) zur Färbung der chromatischen Kernfigur sehr geeignet. In den meisten Fällen erhält man übrigens auch bei der Fixierung mit Alkohol (§ 300) oder alkoholischer Sublimat- (§ 310) oder Pikrinsäure-Lösung (§ 303) und bei der Färbung nach einer der oben genannten Methoden oder mit einer der vielen Haematoxylin- (§ 314—317) und Carminlösungen (§ 318 und 319) recht gute Bilder der karyokinetischen Kernteilungsfiguren.

Erwähnen will ich an dieser Stelle noch, dass man vielfach die karyokinetischen Figuren auch ohne vorherige Fixierung dadurch gut sichtbar machen kann, dass man Schnitte von lebenden Pflanzenteilen direkt in konzentrierte wässerige Lösung von *Chloralhydrat* einträgt, in der von dem gesamten Zellinhalte im allgemeinen nur die Kerne erhalten bleiben und namentlich auch die chromatische Figur der in karyokinetischer Teilung begriffenen Kerne scharf hervortritt. In dieser Weise erhielt ich z. B. bei jungen Farnblättern sehr instruktive Bilder.

§ 342. Im Gegensatz zu der chromatischen Kernfigur ist es nun in den meisten Fällen schwer die sogenannte *achromatische Kernfigur* mit voller Deutlichkeit sichtbar zu machen. Dieselbe ist zwar auch in einem gewissen Grade tinktionsfähig, namentlich bei Anwendung von Haematoxylin oder bei der Doppelfärbung mit Fuchsin und Methylblau (cf. § 325), wo die chromatische Kernfigur rot, die achromatische blau gefärbt erscheint. Trotzdem ist es auch bei diesen Präparaten schwer die einzelnen Spindelfasern, aus denen die achromatische Kernfigur sich aufbaut deutlich zu unterscheiden, in schwierigeren Fällen, wie z. B. bei vielen Pilzen, ist es überhaupt meist nicht möglich die achromatische Figur in dieser Weise zur Anschauung zu bringen. Hier dürfte eine Vorbehandlung mit Reagentien eher zum Ziele führen.

In wieweit nun in diesen Fällen die neuerdings von Flemming und Hermann in erster Linie für tierische Objekte empfohlenen Methoden (cf. § 322—324) zum Ziele führen werden,

muss noch durch weitere Untersuchungen festgestellt werden (vergl. auch § 348 a—e).

IV. Die Einschlüsse des Kernes (Proteïnkrystalloide).

§ 343. Wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, sind *Proteïnkrystalloide* in den Kernen der Pteridophyten und Angiospermen ziemlich verbreitet (cf. Zimmermann II, 54 u. III, 112), immerhin gehören sie doch keineswegs zu den konstanten Bestandteilen derselben, und es scheint mir somit berechtigt, dieselben als Einschlüsse des Kernes aufzufassen, ähnlich wie die in den Chromatophoren enthaltenen Stärkekörner und Krystalloide. Andere heterogene Einschlüsse sind bisher innerhalb der Kerne nicht nachgewiesen.

§ 344. Zur *Erkennung* der Proteïnkrystalloide kann in vielen Fällen schon die regelmässige *Krystallform* dienen; so kann z. B. bei den in Fig. 34, 2 u. 4 abgebildeten Krystalloiden aus dem Blatt von Melampyrum arvense und Candollea adnata die krystallinische Struktur wohl schwerlich in Frage gestellt werden. Daneben findet man sehr häufig auch nadel- oder stäbchenförmige, wie z. B. innerhalb der Samenkospen von Mimulus Tillingi (Fig. 34, 6), oder solche, die in verschiedener Weise gekrümmt sind, wie z. B. sehr häufig in der Fruchtknotenwandung von Campanula trachelium (Fig. 34, 1). Schliesslich sind nun aber auch Körper von dem gleichen chemischen Verhalten sehr verbreitet, die in ihrer Gestalt nur wenig oder überhaupt nicht von der Kugelform abweichen, wie z. B. im Blatt von Lophospermum scandens (cf. Fig. 34, 3). In solchen Fällen ist natürlich der sichere Nachweis der Zugehörigkeit zu den Krystalloiden und namentlich auch die Unterscheidung zwischen diesen und den Nukleolen bei der alleinigen Beobachtung des lebenden Materiales nicht möglich.

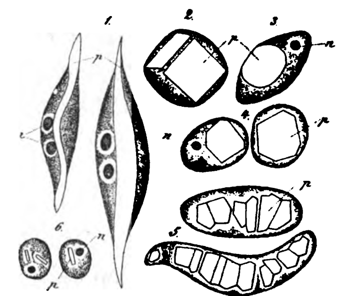


Fig. 34. 1. Kerne aus der Epidermis der Fruchtknotenwandung von Campanula trachelium. 2. Kern aus dem Schwammparenchym des Blattes von Melampyrum arvense. 3. Kern aus der Epidermis des Blattes von Lophospermum scandens. 4. Kerne aus dem Palisadenparenchym des Blattes von Candollea adnata. 5. Kerne aus der Wandung einer fast reifen Frucht von Alectorolophus major. 6. Kerne aus der Samenknospe von Mimulus Tillingi. n. Nucleolus. p. Proteïnkrystalloide.

Diese Unterscheidung lässt sich aber mit Hilfe geeigneter *Tinktionsmethoden* leicht und sicher ausführen. Dieselben können nur darüber noch einen Zweifel übrig lassen, ob alle diejenigen Körper, die mit den unzweifelhaften Krystalloiden übereinstimmen, wirklich als stofflich identisch zu betrachten sind; als festgestellt kann dagegen gelten, dass sie mit irgendwelchen anderen *bekannten* Einschlüssen des Kernes jedenfalls sämtlich *nicht* identisch sind.

Zum Nachweis der Krystalloide benutzt man nun am besten die Fixierung mit konzentrierter alkoholischer Sublimatlösung (cf. § 310) und Färbung mit Säurefuchsin oder eine Doppelfärbung mit Säurefuchsin und Haematoxylin. Was nun zunächst die Färbung mit Säurefuchsin, das auch wohl als Fuchsin S nach Weigert bezeichnet wird, anlangt, so kann man diese in sehr verschiedener Weise ausführen; am besten bewährt haben sich aber bisher die folgenden 3 Methoden (cf. Zimmermann II, 12 u. 55 u. III, 113).

a. Die Altmann'sche Säurefuchsin-Färbung.

§ 345. Dieselbe ist in erster Linie für Mikrotomschnitte anwendbar. Diese werden auf dem Objektträger festgeklebt und nach der Entfernung des Paraffins mit einer Lösung von 20 gr Säurefuchsin in 100 ccm Anilinwasser [1]) bedeckt und dann solange erwärmt, bis die Unterseite des Objektträgers bei der Berührung empfindlich heiss ist. Ein Kochen der Lösung ist jedoch zu vermeiden, während selbst ein vollständiges Eintrocknen derselben für die Tinktion nicht nachteilig ist. Hat der Farbstoff etwa 2—5 Minuten oder auch beliebig länger eingewirkt, so wird er durch ein Gemisch von 1 Teil konzentrierter alkoholischer Pikrinsäurelösung und 2 Teilen Wasser abgespült, und zwar ist das Auswaschen mit dieser Pikrinsäurelösung im allgemeinen solange fortzusetzen, bis die Schnitte keine sichtbaren Farbstoffmengen mehr an dieselbe abgeben; in manchen Fällen kann man aber auch dadurch, dass man das Auswaschen mit Pikrinsäure früher oder später unterbricht, verschiedene Färbungsintensitäten erhalten. Die Pikrinsäure wird schliesslich durch Alkohol entfernt und das Präparat in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam eingeschlossen.

Erwähnen will ich noch, dass man nach der Altmann'schen Vorschrift die Schnitte nach dem Abspülen mit Pikrinsäure in dieser Lösung nochmals gelinde erwärmen soll, um gute Diffe-

---

1) Diese Lösung ist gut haltbar, muss nur von Zeit zu Zeit filtriert werden.

renzierungen zu erhalten. Ich habe jedoch bei pflanzlichen Objekten bei diesem Erwärmen der Pikrinsäure bisher in den meisten Fällen keine guten Resultate erzielt, während mir diese Methode sonst vielfach sehr gute Dienste geleistet hat.

Man erhält mit derselben auch stets eine sehr intensive Färbung der Zellkernkrystalloide; allerdings steht sie in dieser Hinsicht den beiden folgenden Methoden insofern nach, als sie namentlich in jugendlichen Zellen — wenigstens bei der Fixierung mit Sublimat — auch den Nucleolus ziemlich intensiv färbt.

b. Die Säurefuchsin-Methode B.

§ 346. Die zweite Methode, die ich als *Säurefuchsin-Methode B* bezeichnet habe (cf. Zimmermann II, 14), ist sowohl für Freihandschnitte als auch für Mikrotomschnitte geeignet. Nach dieser kommen die gut ausgewaschenen Schnitte zunächst in eine 0,2% Lösung von Säurefuchsin in destilliertem Wasser, der ich, um sie haltbarer zu machen, etwas Kampfer zugesetzt habe.

In dieser Lösung verweilen sie mindestens mehrere Stunden, am besten 24 Stunden oder auch beliebig länger [1]). Darauf werden sie möglichst schnell in fliessendem Wasser ausgewaschen (cf. § 39). Die hierzu erforderliche Zeit ist für die verschiedenen Objekte eine sehr verschiedene und schwankt zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden. Uebrigens lässt sich dieselbe leicht durch ein Paar Versuche feststellen. Nach dem Auswaschen werden dann die Präparate in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam übertragen.

Bei Anwendung dieser Methode erhielt ich sowohl bei Mikrotomschnitten, als auch bei Freihandschnitten eine sehr gute Färbung der Zellkernkrystalloide. Dieselben waren hier stets noch intensiv gefärbt, wenn alle übrigen Bestandteile der Kerne, namentlich auch die Nukleolen längst entfärbt waren.

c. Die Säurefuchsin-Kaliumbichromat-Methode.

§ 347. Die dritte Methode, die man vielleicht kurz als die *Säurefuchsin-Methode C* bezeichnen könnte, stimmt mit der Altmann'schen Methode (§ 345) zunächst völlig überein, insofern

---

1) Will man zahlreiche Schnitte gleichzeitig in dieser Weise färben, benutzt man zweckmässig das § 37 beschriebene Gefäss.

auch hier die Mikrotomschnitte mit der konzentrierten Säurefuchsinlösung erwärmt werden; zum Auswaschen wird dann aber an Stelle der Pikrinsäure erwärmte Kaliumbichromatlösung benutzt, und zwar kommt es hier weder auf die Konzentration der Lösung noch auf Einhaltung einer bestimmten Temperatur an. Ich benutzte meist eine konzentrierte wässerige Lösung des genannten Salzes, die ich im Paraffinofen auf 50—60° erhitzt habe; doch kann man selbst kochende Kaliumbichromatlösung verwenden. Sind die Präparate genügend ausgewaschen, was man denselben bei einiger Uebung meist direkt ansieht, sonst aber leicht durch einige Probeversuche feststellen kann, so wird das Kaliumbichromat schnell mit Wasser entfernt und dann das Präparat in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam übertragen.

Bei Anwendung dieser Methode erhielt ich stets sehr scharfe Färbungen der Zellkernkrystalloide; dieselben waren auch hier noch intensiv gefärbt, wenn der Nucleolus längst völlig ausgewaschen war.

d. Die Doppelfärbung mit Säurefuchsin und Haematoxylin.

§ 348. Diese Methode kann ebenfalls in sehr verschiedener Weise ausgeführt werden. Im allgemeinen fand ich es jedoch am zweckmässigsten, die betreffenden Objekte zunächst mit Delafield'schem Haematoxylin (cf. § 314) durchzufärben und dann die aus denselben angefertigten Mikrotomschnitte nach der Methode B mit Säurefuchsin nachzufärben (cf. § 346). Man konnte dann in ein und demselben Kerne innerhalb des violettgefärbten Kerngerüstes neben dem ebenfalls intensiv blauvioletten Nucleolus die intensiv rot gefärbten Krystalloide beobachten. Diese Methode hat sich auch bei der Verfolgung der Krystalloide während der Karyokinese sehr gut bewährt (Zimmermann, III, 119).

2. Die Centralkörper.

§ 348a. Nachdem bereits von verschiedenen Autoren (cf. Flemming I u. III) innerhalb tierischer Zellen das Vorhandensein sogenannter *Centralkörper* oder *Attraktionssphaeren* nachgewiesen war, hat neuerdings Guignard (IV) dieselben auch in verschiedenen Pflanzenzellen beobachten können, und es ist schon jetzt als nicht unwahrscheinlich anzusehen, dass diese Körper zu den konstanten Bestandteilen der Zelle gehören.

Die Attraktionssphaeren, die von Guignard auch als »*sphères directrices*« bezeichnet werden, bestehen nun aus einem im allgemeinen kugelförmigen Kerne (»centrosome« nach Guignard) der von einer nicht tinktionsfähigen Hülle umgeben ist, und sind meist zu zweit in jeder Zelle vorhanden (cf. Fig. 35 und 36a). Sie scheinen namentlich bei der Karyokinese eine grosse Rolle zu spielen; wenigstens bilden sie nach ihrem Auseinanderweichen die Mittelpunkte der im Cytoplasma beobachteten strahligen Strukturen (cf. Fig. 36, II), und auch die achromatischen Spindelfasern (cf. § 342) laufen nach beiden Seiten hin nach den Attraktionssphaeren zusammen (cf. Fig. 36, III u. IV). Gleichzeitig mit der Trennung der Kernfadensegmente findet auch eine Teilung der Attraktionssphären statt (cf. Fig. 36, IV), so dass auf jeden Tochterkern wieder zwei Attraktionssphaeren kommen, die

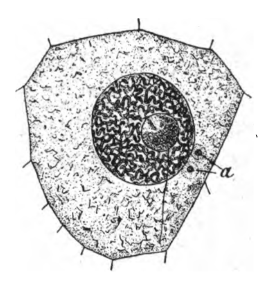


Fig 35. Embryosack von Lilium Martagon vor der ersten Kernteilung a Centralkörper. Nach Guignard.

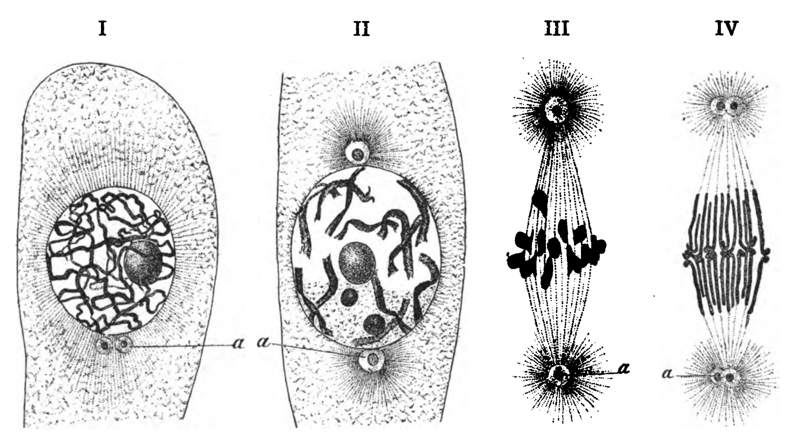


Fig. 36. Lilium Martagon. I Spitze des Embryosackes. II Idem, älteres Stadium. III und IV Aeltere Kernteilungsfiguren ebendaher. a Attraktionssphaeren. Nach Guignard.

aber zunächst nahe bei einander bleiben und erst mit dem Beginn der abermaligen Karyokinese sich von einander entfernen.

Bei dem Sexualakte der Angiospermen treten nach den Untersuchungen von Guignard gleichzeitig mit dem männlichen

Kerne auch dessen Attraktionssphaeren in die Eizelle über, und es findet dann eine paarweise Verschmelzung der Centralkörper männlichen und weiblichen Ursprungs statt (cf. Fig. 37).

§ 348b. Zur Sichtbarmachung der Attraktionssphaeren empfiehlt Guignard (IV, 166) zunächst *Fixierung* mit Alkohol, 20—30 % alkoholischer Lösung von Sublimat oder Pikrinsäure, 1 % wässeriger Sublimatlösung, gesättigter wässeriger Pikrinsäure-Lösung und 0,5 % Lösung von Chromsäure. Auch Osmiumsäuredämpfe hat er angewandt, dieselben lässt er, um die Tinktionsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen nur kurze Zeit einwirken und legt die Objekte dann für einige Viertelstunden in Flemming'sche Lösung (cf. § 309) und darauf in Alkohol.

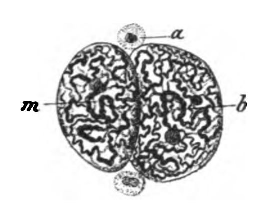


Fig. 37. Kerne aus der befruchteten Eizelle von Lilium Martagon während der Verschmelzung. m männlicher, b weiblicher Kern, a Attraktionssphaeren. Nach Guignard.

Zur *Färbung* der Attraktionssphaeren benutzt Guignard namentlich Haematoxylin; doch behandelt er die mit Alkohol gehärteten Schnitte zuvor mit 10 % Lösung von Zinksulfat oder Ammoniakalaun. Ausserdem hat er auch die Präparate succesive mit einer verdünnten wässerigen Lösung von Orseillin und Eosin-Haematoxylin [1]) behandelt. Durch diese Behandlungsweise wird das Innere der Attraktionsphaeren intensiv rot gefärbt.

Zum *Einschluss* derartiger Präparate empfiehlt Guignard namentlich Glyceringelatine und eine mit Gelatine versetzte 10 % Lösung von Chloralhydrat. Die Letztere hat den Vorteil die Präparate aufzuhellen, zerstört aber allmählich die meisten Farbstoffe.

§ 348c. Es gelang nun Guignard bisher namentlich in verschiedenen Sexualzellen die Attraktionssphaeren sichtbar zu machen. Bei den noch im Wachstum begriffenen Staubfädenhaaren von Tradescantia konnte er dies aber auch dadurch erreichen, dass er dieselben zunächst mit Dämpfen von Osmium-

---

1) Es ist hier voraussichtlich das von Renault empfohlene Eosin-Haematoxylin-Gemisch gemeint. Dasselbe wird nach Gierke (I, 86) bereitet durch Vermischen von gleichen Teilen von kochsalzhaltigem Glycerin, in dem Eosin bis zur Sättigung gelöst ist, und einer gesättigten Lösung von Kalialaun in Glycerin. Dies Gemisch wird filtriert und dann alkoholische Haematoxylinlösung oder Delafield'sches Haematoxylin (cf. § 314) zugesetzt.

säure und dann mit dem Flemming'schen Chromosmiumessigsäure-Gemisch und mit Alkohol behandelte und dann mit einem Gemisch von Fuchsin und Methylgrün tingierte. Ist die Mischung von Fuchsin und Methylgrün richtig getroffen, so sind dann die Attraktionssphaeren lebhaft rot gefärbt innerhalb des blassroten Protoplasmas.

§ 348 d. Bei tierischen Zellen wurde neuerdings von Hermann (II, 583) zur Sichtbarmachung der Centralkörper und der von denselben ausgehenden strahligen Strukturen folgende Methode angewandt: Die mit Platinchlorid-Osmium-Essigsäure fixierten und sodann in der § 313 angegebenen Weise mit Holzgeist reduzierten Objekte wurden in toto im Dunkeln in eine Haematoxylinlösung gebracht, die 1,0 Teil Haematoxylin, 70,0 Teile Alkohol und 30,0 Teile Wasser enthielt; in dieser Lösung blieben sie 12—18 Stunden und wurden dann ebenfalls im Dunkeln die gleiche Zeit hindurch mit 70% Alkohol behandelt und hierauf eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden dann mit einer Lösung von Kalihypermanganat, die so verdünnt war, dass sie eine hellrosa Färbung besass, extrahiert, bis sie ein ockerfarbiges Aussehen zeigten. Nach flüchtigem Abspülen in Wasser wird das Mangansuperoxyd durch eine Lösung von 1 Teil Oxalsäure und 1 Teil Kaliumsulfat auf 1000—2000 Teilen Wasser gelöst und dann die Schnitte 3—5 Minuten mit Safranin nachgefärbt. Es erschienen dann die Centralkörper und die dieselben umgebenden Strukturen intensiv geschwärzt, während die Kernelemente eine leuchtend rote Färbung besassen.

In wieweit nun übrigens diese Methode auch bei Pflanzenzellen mit Erfolg anzuwenden ist, bleibt noch zu untersuchen. Erwähnen will ich in dieser Hinsicht nur noch, dass die von Flemming mit bestem Erfolg bei tierischen Zellen angewandten Methoden (cf. § 323) für Pflanzenzellen nach Guignard (IV, 167) wenig geeignet sein sollen. Ebenso erhielt ich unter Anwendung der Hermann'schen Methoden bei einigen allerdings nicht sehr ausgedehnten Versuchen keine Tinktion der Centralkörper, während die Spindelfasern an derartigen Präparaten, namentlich nach der Färbung mit Gentianaviolett, sehr scharf hervortraten.

3. Die Chromatophoren und ihre Einschlüsse.

§ 349. Unter der Bezeichnung Chromatophoren fasst man bekanntlich zur Zeit gewöhnlich drei verschiedene Arten von Körpern zusammen: die grüngefärbten Chlorophyllkörper oder *Chloroplasten* und die entsprechenden Körper der nicht grünen Algen, die meist gelb oder rot gefärbten Farbstoffkörper oder *Chromoplasten,* die sich namentlich in den buntgefärbten Blütenteilen und Früchten befinden, und die farblosen *Leukoplasten*, die hauptsächlich in unterirdischen und jugendlichen Pflanzenteilen angetroffen werden. Die Zusammenstellung dieser verschiedenen Körper wird ganz abgesehen von ihrer stofflichen Verwandtschaft dadurch gerechtfertigt, dass dieselben, wie namentlich von Schimper nachgewiesen wurde, mit einander in genetischem Zusammenhange stehen und in der verschiedensten Weise in einander übergehen können.

A. Untersuchungsmethoden.

§ 350. Die Beobachtung der Chromatophoren geschah bisher vorwiegend in der *lebenden Zelle*. Natürlich ist dies nur möglich an Schnitten, die mindestens mehrere Zellschichten dick sind; ausserdem ist eine möglichst schnelle Präparation geboten, da die Chromatophoren gegen die verschiedenartigsten schädlichen Einflüsse sehr empfindlich sind. Da ferner die meisten Zellen auch in reinem Wasser sehr schnell absterben und namentlich auch die Chromatophoren in diesem sofort tiefgreifende Strukturveränderungen erleiden, so ist es vorteilhaft, als Beobachtungsflüssigkeit eine verdünnte Salz- oder Zuckerlösung zu wählen. Ich benutzte z. B. mit gutem Erfolg 5 % Zuckerlösung, mit der ich die betreffenden Pflanzenteile, um die in den Intercellularen enthaltene Luft zu entfernen, injicierte, was mit Hilfe einer Wasserluftpumpe in den meisten Fällen leicht ausgeführt werden konnte (cf. ferner § 5).

§ 351. In schwierigeren Fällen wird man allerdings auch hier zu den *Tinktionsmethoden* seine Zuflucht nehmen müssen. Zur *Fixierung* fand ich sehr geeignet, konzentrierte alkoholische *Sublimatlösung* (cf. § 310); auch konzentrierte alkoholische *Pikrinsäurelösung* leistete vielfach gute Dienste.

Nach meinen neuesten Erfahrungen scheint mir jedoch am allergünstigsten zur Fixierung der Chromatophoren eine gesättigte Lösung von Pikrinsäure und Sublimat im absoluten Alkohol zu sein. Ich lasse dieselbe im allgemeinen ca. 24 Stunden auf die zu fixierenden Objekte einwirken und benutze zum Auswaschen des Pikrinsäure-Sublimatgemisches fliessendes Wasser. Die Anwendung von Jodlösung zum Auswaschen des Sublimats scheint hier überflüssig, wenigstens habe ich bisher in meinen Präparaten niemals die bekannten Sublimatnadeln beobachtet.

§ 352. Zur *Färbung* der Chromatophoren wurde von Schimper Haematoxylin und Gentianaviolett verwandt, geeigneter fand ich dagegen *Jodgrün, Fuchsin* und *Säurefuchsin* (cf. Zimmermann V, 6).

Die Färbung mit *Säurefuchsin* geschieht am besten nach einer der drei § 345—347 angeführten Methoden. So ist es z. B. leicht, mit Hilfe der Methode B in den äusseren Schichten einer reifen Kartoffel die relativ kleinen Leukoplasten an jedem Stärkekorne deutlich sichtbar zu machen (cf. Fig. 38, l).

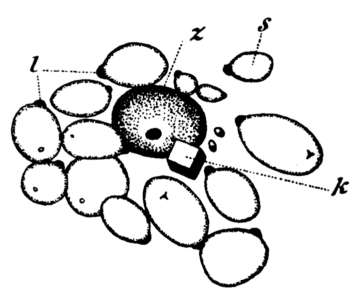


Fig. 38. Zellinhalt aus einer wenige Schichten vom Kork entfernten Parenchymzelle der Knolle von Solanum tuberosum. Nach der Fixierung mit Sublimat-Alkohol und Färbung mit Säurefuchsin (Methode B). l Leukoplasten, s Stärkekörner, z Zellkern, k Krystalloid.

§ 353. Das *Jodgrün* wandte ich in konzentrierter wässeriger Lösung an, und liess dasselbe entweder nur kurze Zeit (1/2 oder wenige Minuten) auf die Mikrotomschnitte einwirken, spülte dann den Farbstoff mit Wasser ab und beobachtete in Glycerin; oder ich liess die Jodgrünlösung längere Zeit einwirken und tauchte die Schnitte dann in eine Ammoniaklösung, die durch Vermischen von 2 Teilen der gewöhnlichen Ammoniaklösung und 98 Teilen Wasser dargestellt war. In dieser Lösung beliess ich die Schnitte je nach der Intensität der Färbung und der Beschaffenheit des Präparates einige Minuten bis mehrere Stunden. Die Beobachtung geschah zweckmässig ebenfalls in Glycerin. Derartige Präparate halten sich aber nur eine sehr beschränkte Zeit, während es gelang, durch Uebertragung in Canadabalsam auch von den mit Jodgrün gefärbten Schnitten sehr haltbare Dauerpräparate

darzustellen. Bei dieser Uebertragung ist aber Alkohol gänzlich zu vermeiden, da er die Chromatophoren auswaschen würde, auch Phenol und Anilin erwiesen sich nicht als geeignet; ich verfuhr daher einfach in der Weise, dass ich die mit Wasser ausgewaschenen Mikrotomschnitte austrocknen liess, dann direkt mit Xylol durchtränkte und schliesslich Xylol-Canadabalsam zusetzte.

§ 354. Zur Färbung mit *Fuchsin* benutzte ich das bereits § 271 erwähnte Ammoniakfuchsin. Ich lasse dasselbe nur kurze Zeit auf die Schnitte einwirken, bis dieselben anfangen sich zu röten; dann wasche ich mit Wasser aus und beobachte in Glycerin oder übertrage in der soeben besprochenen Weise durch Austrocknenlassen in Canadabalsam. Alkohol wäscht auch hier den Farbstoff aus den Chromatophoren sofort aus.

B. Die feinere Struktur der Chromatophoren.

§ 355. Ueber die feinere Struktur der Chromatophoren sind die Ansichten zur Zeit noch geteilt (vergl. bezüglich der älteren Litteratur: Zimmermann I, 56 und ferner Bredow I, 380). Nur hinsichtlich der Chromoplasten kann zur Zeit als festgestellt gelten, dass bei ihnen der Farbstoff teils in krystallinischer, teils in amorpher Form auftritt.

§ 356. In ersterem Falle bildet er bald mehr oder weniger regelmässig gestaltete rhombische Tafeln oder eigenartig cylinderartig gekrümmte Körper, wie z. B. in den Parenchymzellen der Möhre (vergl. Figur 39, II), oder er tritt in Form zarter

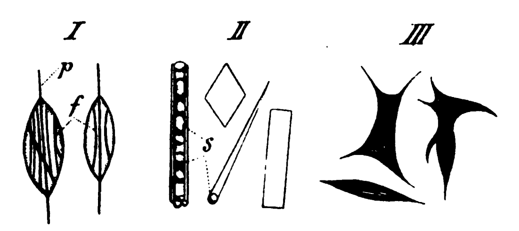


Fig. 39. I Chromoplasten aus der Blüte von Neottia nidus-avis. p. Proteïnkrystalloid, f Farbstoffkrystalle. II Id. aus der Wurzel von Daucus carota. III Id. aus der Frucht von Sorbus aucuparia. s Stärkekörner. Nach Schimper.

Nadeln auf, die entweder in geringer Anzahl, wie bei Neottia nidus avis (Fig. 39, I) oder in grosser Menge dem farblosen Stroma eingebettet sind, wie z. B. in dem Fruchtfleisch von Sorbus aucu-

paria (Fig. 39, III). Alle diese Farbstoffkrystalle, die nach der zur Zeit herrschenden Nomenklatur aus Carotin bestehen, sind durch starken Pleochroismus ausgezeichnet [1]), und es wurde diese Eigenschaft auch von Schimper (III, 94) in schwierigeren Fällen zum Nachweis der krystallinischen Struktur der feinen Farbstoffnadeln verwandt.

§ 357. Der amorphe Farbstoff findet sich innerhalb stark lichtbrechender Kugeln (»*Grana*«), die dem häufig völlig farblosen Stroma eingebettet sind. So enthalten z. B. die fleischfarbigen fertilen Stengel von Equisetum arvense Chromatophoren mit besonders grossen Granis (Fig. 40).

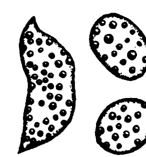


Fig. 40. Chromoplasten aus dem Parenchym des Stengels von Equisetum arvense (1400).

Die Beobachtung der krystallinischen und amorphen Farbstoffe kann natürlich nur innerhalb der lebenden Zellen mit voller Sicherheit geschehen, und es ist hier der leichten Zersetzbarkeit derselben halber das strenge Einhalten der § 350 beschriebenen Vorsichtsmassregeln geboten.

C. Die Einschlüsse der Chromatophoren.

§ 358. Von den Einschlüssen der Chromatophoren sollen die am meisten verbreiteten, die *Stärkekörner*, gemeinsam mit verschiedenen verwandten Körpern in § 400 u. ff. gemeinsam behandelt werden. Ausserdem sind nun innerhalb der Chromatophoren noch *Proteïnkrystalloide, Leukosomen*, *Pyrenoide* und *Oeltropfen* nachgewiesen, die jetzt der Reihe nach besprochen werden sollen.

a. Proteïnkrystalloide.

§ 359. Die namentlich von Schimper (III) und A. Meyer (II) innerhalb der Chromatophoren beobachteten Proteïnkrystalloide bilden häufig langgestreckte Prismen (cf. Fig. 41, 2) oder Nadeln (Fig. 41, 1 und Fig. 39, I, p); nicht selten sind sie aber auch mehr

1) Derselbe wird in der Weise festgestellt, dass man die betreffenden Körper unter Anwendung eines Nikols, am besten des Polarisators, beobachtet und entweder den Nikol oder die Krystalle dreht. Die pleochroitischen Objekte erscheinen dann in einer Lage ganz farblos oder wenigstens sehr hell gefärbt und nach einer Drehung um 90° intensiver gefärbt als ohne Anwendung des Nikols.

octaëderförmig oder mehr oder weniger unregelmässig gestaltet (cf. Fig. 41, 1, 3 und 4).

Sie sind mit Ausnahme derer von Canna in Wasser löslich, werden aber durch die Fixierungsmittel der Proteïnstoffe fixiert. Sehr geeignet fand ich zum Nachweis derselben die gleichen Methoden, die bei den Untersuchungen der Zellkernkrystalloide angewandt wurden (cf. § 345 bis 347). Am besten bewährt hat sich Fixierung mit alkoholischer Sublimatlösung und Färbung mit Säurefuchsin nach der Methode C. Es gelang in dieser Weise relativ leicht, Präparate zu erhalten, in denen das Stroma der Chromatophoren völlig farblos war, während die Krystalloide noch intensiv rot gefärbt waren.

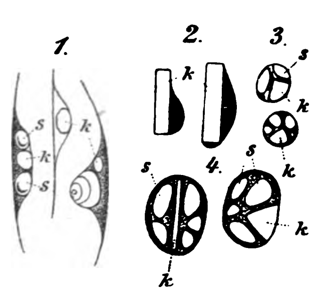


Fig. 41. 1. Leukoplasten aus einem jungen Spross von Canna Warszewiczii mit Krystallnadeln und octaëdrischen Krystallen. 2. Chloroplasten aus der Epidermis des Blattstieles von Hedera spec. 3. Chloroplasten aus dem Palisadenparenchym des Blattes von Convolvulus tricolor. 4. Chloroplasten aus dem Palisadenparenchym des Blattes von Achyranthes Verschaffelti. k Proteïnkrystalloide, s Stärkekörner. 1. Nach Schimper.

b. Leukosomen.

§ 360. Innerhalb der Leukoplasten der Epidermis verschiedener Tradescantia spec. und auch bei verschiedenen anderen Gewächsen fand ich kugelförmige Einschlüsse, die ich vorläufig als Leukosomen bezeichnet habe (cf. Zimmermann II, 3 und III, 147). Dieselben bestehen jedenfalls zum grössten Teil aus proteïnartiger Substanz und dürften wohl mit den soeben besprochenen Proteïnkrystalloiden, mit denen sie auch in ihrem Verhalten gegen Säurefuchsin übereinstimmen, in stofflicher Beziehung nahe verwandt sein.

In günstigen Fällen, wie z. B. bei der Epidermis der Blätter von Tradescantia discolor, sind die Leukosomen sehr gut innerhalb der lebenden Zelle zu beobachten, und zwar sind hierzu namentlich Tangentialschnitte geeignet. Sie finden sich hier meist in Einzahl oder auch zu 2 oder 3 innerhalb jedes Leukoplasten (cf. Fig. 42, 1).

Da jedoch die Leukosomen schon in Wasser löslich und überhaupt gegen die verschiedenartigsten Agentien sehr empfindlich

sind, wird man sich im allgemeinen wohl besser an fixiertes und tingiertes Material halten.

Man verfährt dann am zweckmässigsten in der Weise, dass man Schnitte von dem lebenden Objekte in konzentrierter alkoholischer Sublimatlösung fixiert und nach dem Auswaschen (cf. § 310) nach der § 346 beschriebenen Säurefuchsinmethode B tingiert. Wenn das Auswaschen im richtigen Momente unterbrochen ist, sind dann die Leukosomen allein intensiv gefärbt.

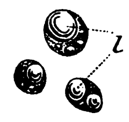


Fig. 42. Leukoplasten aus der Epidermis der Blattoberseite von Tradescantia discolor. l Leukosomen.

c. Pyrenoide.

§ 361. Die in den Chromatophoren verschiedener Algen und von Anthoceros beobachteten *Stärkeheerde* oder *Pyrenoide* bestehen bekanntlich meist aus einem aus Proteïnstoffen bestehenden *Kerne* und der denselben umschliessenden *Stärkehülle.*

Der wesentlichste Bestandteil des Pyrenoids, der Eiweisskern, scheint nach den Beobachtungen von Schimper (III, 74) häufig mehr oder weniger regelmässige Krystallformen zu besitzen (cf. Fig. 43, 2). Uebrigens kommen sicher auch *nicht* krystallinische Pyrenoide vor, so z. B. das Fig. 43, 3 abgebildete Pyrenoid, das höchst wahrscheinlich ein Teilungsstadium darstellt (cf. Zimmermann I, 48). Aehnliche Formen wurden neuerdings auch von Klebahn (I, 426) bei Cosmarium beobachtet.

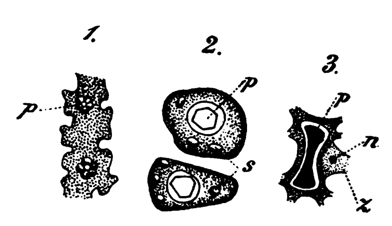


Fig. 43. 1 Stück eines Chromatophors von Spirogyra spec. 2 Chromatophoren einer Cladophora spec. 3 Eingeschnürtes Pyrenoid einer Zygnema spec. nach der Fixierung mit Pikrinsäure und Färbung mit Säurefuchsin. p Pyrenoid, s Stärkekörner, z Zellkern, n Nucleolus. 2 Nach Schimper.

§ 362. Bei Gegenwart grösserer Stärkemengen ist übrigens der Proteïnkern der Pyrenoide innerhalb der lebenden Zelle nur schwer oder überhaupt nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Es empfiehlt sich dann die Anwendung geeigneter *Tinktionsmittel,* gegen die sich die Pyrenoide ungefähr in der gleichen Weise verhalten, wie die Krystalloide des Zellkernes und der Chromatophoren. So erhält man eine sehr intensive Färbung derselben, wenn man die mit Pikrinschwefelsäure (cf. § 304)

oder alkoholischer Sublimatlösung (cf. § 310) fixierten und gut ausgewaschenen Algen mindestens 24 Stunden lang in 0,2 % Säurefuchsinlösung belässt, dann ca. 1/4 Stunde mit Wasser auswäscht, darauf im Schulze'schen Entwässerungs-Gefäss (cf. § 16) entwässert und schliesslich mit Hilfe des Schulze'schen Senkcylinders (cf. § 21) in Canadabalsam überträgt. Bei gut gelungenen Präparaten sind dann allein die Pyrenoide intensiv rot, auch die Nukleolen ganz farblos.

§ 363. Eine gleichzeitige Fixierung und Färbung der Chromatophoren und Pyrenoide kann man auch in einfacherer Weise dadurch erhalten, dass man die betreffenden Algen in eine konzentrierte Lösung von Pikrinsäure in 50% Alkohol bringt, der etwas Säurefuchsin zugesetzt ist (etwa 5 Tropfen der § 345 erwähnten konzentrierten Altmann'schen Lösung auf ein Uhrgläschen der Pikrinsäure-Lösung). In dieser verweilen sie 2 Stunden oder beliebig länger und werden dann ca. 1/4 Stunde in Alkohol ausgewaschen (nicht vorher in Wasser!) und dann zweckmässig möglichst schnell — etwa mit Hilfe des Schulze'schen Senkcylinders cf. § 21 — in Canadabalsam übertragen. Die so erhaltenen Präparate scheinen sehr gut haltbar zu sein, während bei den in dem Vosserler'schen Terpentin (cf. § 27) eingeschlossenen Objekten ein allmähliches Abblassen eintrat.

§ 363a. Eine kompliziertere Zusammensetzung scheinen übrigens nach neueren Untersuchungen von Hieronymus (I, 358) die Pyrenoide von Dicranochaete reniformis zu besitzen, die nach den Angaben dieses Autors aus einem *Proteïnkrystalloid* und einer ebenfalls proteïnartigen *Hüllmasse* bestehen, während die Stärkekörner ganz unabhängig von den Pyrenoiden an beliebigen Stellen des Chloroplasten gebildet werden.

Die *Krystalloide* sollen sich nach Hieronymus in kochendem *Wasser* (!), verdünnter und konzentrierter *Kalilauge* sowie in *Kochsalzlösung, Essigsäure* und *Salzsäure* lösen. Nach vorheriger Behandlung mit *Alkohol* soll die Löslichkeit jedoch geringer sein. Nach mehrere Tage andauerndem Liegen in einem Gemisch von 1 Volum *Pepsin-Glycerin* und 3 Volumen 0,2% *Salzsäure* wurden die Krystalloide sehr durchsichtig. Zur Färbung empfiehlt Hieronymus namentlich *Safranin.*

Die Hülle ist nach Hieronymus ebenfalls löslich in konzentrierter und verdünnter *Kalilauge,* sowie in konzentrierter und verdünnter *Salzsäure*; durch die oben erwähnte Verdauungsflüs-

sigkeit wurde dieselbe jedoch auch bei tagelangem Liegen nicht angegriffen. Zur Färbung der Hülle soll namentlich *Haematoxylin* und *Congorot* geeignet sein. Durch Kombination von *Safranin* und *Haematoxylin* erhielt Hieronymus Präparate, in denen die Hüllmasse violett, die Krystalloide aber intensiv rot gefärbt waren.

d. Oeltropfen.

§ 364. Tropfen von einer ölartigen Substanz sind, wie namentlich von A. Meyer (II) und Schimper (III, 106) nachgewiesen wurde, innerhalb der Chromatophoren ziemlich verbreitet. Nach den Untersuchungen von A. Meyer (II, 17) stimmen dieselben jedoch in ihrem chemischen Verhalten weder mit den echten fetten Oelen, noch auch mit den ätherischen Oelen völlig überein. Bemerkenswert ist namentlich, dass sie schon in verdünntem *Alkohol* löslich, in *Essigsäure* dagegen unlöslich sind. Sie werden ferner durch *Osmiumsäure* nur ganz allmählich gebräunt und sind in *Wasser* stets unlöslich, in *Aether* aber leicht löslich. Gegen *Chloralhydrat* verhalten sie sich verschieden. Nach allen diesen Reaktionen dürften die fraglichen Gebilde wohl sicher zu den fetten Oelen in naher Beziehung stehen, um so mehr, da sie sich auch mit *Alkannin* und *Cyanin* bei Anwendung der oben angegebenen Methoden (cf. § 109—110) intensiv färben. Jedenfalls scheint es mir aber am zweckmässigsten, die fraglichen Körper, so lange keine genaueren Untersuchungen vorliegen, auch fernerhin als Oeltropfen zu bezeichnen, was übrigens auch meistens in der Litteratur geschieht.

Als geeignetes Versuchsobjekt für die Reaktionen dieser Oeltropfen kann ich die Blattepidermis von Agave americana empfehlen. In dieser sind nämlich Leukoplasten enthalten, die namentlich in älteren Blättern stets ziemlich grosse Oeltropfen einschliessen (cf. Fig. 44). In vergilbten Blättern sind dieselben meist zu einem einzigen grossen Tropfen zusammengeflossen, dem gegenüber die übrige Masse der Leukoplasten so sehr zurücktritt, dass sie direkt meist gar nicht mit Sicherheit beobachtet werden kann.

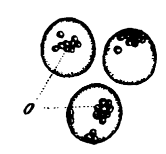


Fig 44. Leukoplasten aus der Epidermis eines ausgewachsenen Blattes von Agave americana. o Oeltropfen.

Namentlich die in den Chromatophoren älterer Blätter beobachteten Oeltropfen sind meist ziemlich intensiv gelb gefärbt. Es beruht dies jedenfalls

auf einem zu der Gruppe der Lipochrome gehörigen Farbstoffe, der vielleicht mit dem Xanthin identisch ist (cf. Zimmermann III, 102).

4. Der Augenfleck.

§ 365. Als *Augenfleck* oder *Stigma* bezeichnet man bekanntlich die bei verschiedenen beweglichen Algen und Schwärmsporen beobachteten roten und bräunlichen Körper, die sich meist in Einzahl am vorderen Ende der betreffenden Organismen befinden. Sie stimmen mit den Chromatophoren insofern überein, als sie ein plasmatisches Stroma besitzen, das mit dem Farbstoff durchtränkt ist. Der letztere scheint bei den grünen Algen, die einen roten Augenfleck besitzen, nach den zur Zeit vorliegenden Untersuchungen mit dem Carotin (cf. § 170) identisch zu sein, wenigstens zeigt derselbe nach Klebs (I, 30) bei Euglena mit Schwefelsäure die charakteristische Blaufärbung.

Die Beobachtung der Augenflecke geschah bisher fast ausschliesslich am lebenden Material.

5. Die Elaioplasten und Oelkörper.

§ 366. Als *Elaioplasten* oder *Oelbildner* bezeichnete Wakker (I, 475) Inhaltskörper der Protoplasten, die er in der Epidermis junger Blätter und in den oberflächlichen Teilen junger Stengel und Wurzeln von Vanilla planifolia beobachtet hat (cf. e Fig. 45). Dieselben bestehen aus einem plasmatischen Stroma und dem eingelagerten Oel. Letzteres wird durch *Alkannin* (cf. § 104) oder *Cyanin* (cf. § 110) intensiv tingiert und tritt in Tropfenform aus den Elaioplasten hervor, wenn dieselben mit wässeriger *Pikrinsäurelösung*, *Eisessig* oder konzentrierte *Schwefelsäure* behandelt werden; in *Alkohol* und *Kalilauge* ist es löslich.

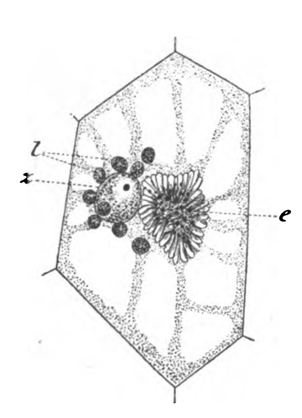


Fig. 45. Epidermiszelle eines sehr jungen Blattes von Vanilla planifolia, e Elaioplast, l Leukoplasten, z Kern. Nach Wakker.

§ 367. Zur *Fixierung* der Elaioplasten empfiehlt Wakker namentlich konzentrierte wässerige *Pikrinsäurelösung*; eine schöne *Doppelfärbung* der mit dieser Flüssigkeit fixierten Schnitte erhielt er mit *Anilinblau* und *Alkannin*, und zwar verfuhr er in folgender Weise: zu einer dunkel-

blauen Lösung von Anilinblau in Wasser setzte er so lange tropfenweise Alkannatinktur hinzu, bis die Flüssigkeit eine dunkelpurpurrote Haematoxylinfarbe angenommen hatte. Er beliess die Schnitte in diesem Gemisch 20 Stunden und untersuchte in Glycerin. Das Plasma war dann hellblau, der Kern und die Chromatophoren dunkelblau, das Oel schön rot und der Elaioplast dunkelpurpur gefärbt. Diese Färbungen sollen sich in neutraler Glyceringelatine längere Zeit halten.

§ 368. Zu den Elaioplasten rechnet Wakker (I, 482) ferner auch die zuerst von Pfeffer (VI) beschriebenen *Oelkörper der Lebermoose*. Er konnte durch anomale Plasmolyse mit 20% Salpeterlösung (§ 432 und § 436) nachweisen, dass dieselben stets im Plasmakörper liegen. Zur Sichtbarmachung der plasmatischen Wandung der Oelkörper empfiehlt Wakker neben dem schon von Pfeffer zu diesem Zwecke angewandten verdünnten *Alkohol* konzentrierte wässerige *Pikrinsäurelösung*. In diesem Falle muss aber der Zutritt der Säure unter dem Mikroskop verfolgt werden, da bei längerer Einwirkung derselben meist ein Platzen der plasmatischen Wandung der Oelkörper stattfindet.

§ 369. Mit den Oelkörpern der Lebermoose sind vielleicht auch die von Radlkofer (I u. II), Monteverde (I) und Solereder (I) beschriebenen *Fett-* und *Oelkörper* verwandt, die von diesen Autoren im Palisaden- und Schwammparenchym verschiedener Vertreter aus den Familien der Cordiaceen, Combretaceen, Cinchoneen, Sapotaceen, Sapindaceen, Gramineen, Gaertneraceen und Rubiaceen beobachtet wurden. Sie liegen hier meist in Einzahl in jeder Zelle und zeigen bei demselben Individuum auch stets annähernd die gleiche Grösse. Im Mesophyll von Avena orientalis besassen sie ungefähr die Grösse der Chloroplasten (cf. Fig. 46 o).

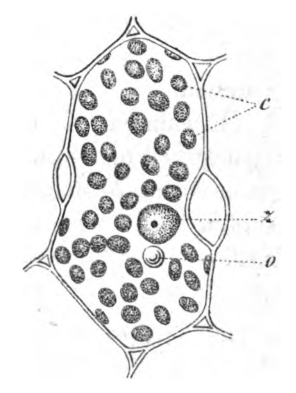


Fig. 46. Mesophyllzelle aus dem Blatt von Avena orientalis. c Chloroplasten, z Zellkern, o Oeltropfen

Nach Monteverde liegen sie im Plasmakörper und sind meist isotrop, bei manchen Pflanzen aber auch doppelbrechend, und zwar soll dies namentlich bei getrockneten Pflanzenteilen der Fall sein. Bei den Gräsern verschwindet diese Doppelbrechung nach Monte-

verde, wenn Schnitte in Wasser auf 50 bis 55° erwärmt werden, sie erscheint jedoch nach wenigen Minuten wieder von neuem.

Gegen Reagentien verhalten sich diese Oelkörper im allgemeinen wie echte Fette. Ich fand dieselben speziell bei Oplismenus imbecillus und Elymus giganteus unlöslich in *Wasser* und *Alkohol*, sowohl kaltem wie kochendem, aber löslich in *Aether, Petroläther, Chloroform, Xylol* und *Nelkenöl*. Durch *Osmiumsäure* wurden sie braun bis schwarz gefärbt. Mit *Cyanin* (cf. § 110) und *Alkannin* (cf. § 109) liessen sie sich ebenfalls intensiv tingieren. Dahingegen blieben sie in einem Gemisch von 1 Volum konzentrierter *Kalilauge* und 1 Volum *Ammoniaklösung* auch nach 24 Stunden in ihrer Form völlig unverändert und scheinen somit in dieser Weise nicht *verseift* werden zu können (cf. § 112).

§ 370. Ausserdem fand übrigens Monteverde sowohl bei krystallführenden, als bei krystallfreien Gräsern Tropfen von ebenfalls ölartigem Aussehen, aber ganz unbekannter Zusammensetzung. Sie sollen sich in *Wasser*, *Glycerin* und verdünnten *Säuren* nur unter Vakuolisierung vergrössern, in *Alkohol* allmählich lösen; nach längerem Aufenthalt in Wasser sollen sie jedoch auch in Alkohol unlöslich werden. In starken *Mineralsäuren* und *Essigsäure* sollen sie sich unter Quellung lösen, momentan in *Kalilauge*, *Ammoniak*, *Aether*, *Chloroform* und *Chloralhydrat*. Sie sollen sich mit *Alkannatinktur* nicht färben, hingegen leicht mit *Anilinfarbstoffen*. Mit *Jod* sollen sie sich bräunen. Monteverde hält es für wahrscheinlich, dass sie der Hauptsache nach aus *Harz* bestehen.

Erwähnen will ich schliesslich an dieser Stelle noch die von Lundström (I) in den Epidermiszellen verschiedener Potamogeton-Arten beobachteten Gebilde, die dieser ebenfalls für Oeltropfen hält, obwohl sie nach seinen Angaben schon durch sehr verdünnten Alkohol gelöst werden.

6 Die irisierenden Plasmaplatten verschiedener Meeresalgen.

§ 371. Wie zuerst von Berthold (II, 685) eingehend beschrieben wurde, finden sich in den oberflächlichen Zellen einiger Meeresalgen eigentümlich irisierende Plasmaplatten, die höchst wahrscheinlich als Schutzorgane gegen zu hohe Beleuchtung aufzufassen sind. Sie bestehen bei den Chylocladien aus einer stark

lichtbrechenden Masse, der kleine Körnchen von etwas verschiedener Grösse eingebettet sind (cf. Fig. 47, a, P). In der Profilansicht lassen sie ferner eine Streifung erkennen, die der Flächenausdehnung der Platten parallel läuft und somit auf einen Aufbau derselben aus verschiedenen Lamellen hinweist (cf. Fig. 47, b). Gegen das Cytoplasma sind die Plasmaplatten stets sehr scharf abgegrenzt.

In destilliertem *Wasser* treten innerhalb derselben Vakuolen auf, höchst wahrscheinlich infolge von Quellung der der Grundmasse derselben eingebettetenKügelchen; schliesslich zeigen die Plasmaplatten eine völlig schwammähnliche Struktur.

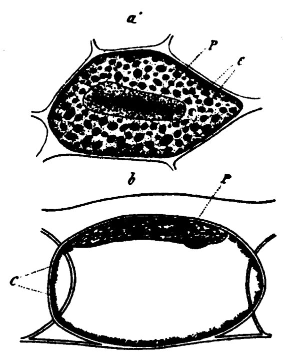


Fig. 47. Oberflächenzelle des Thallus von Chylocladia reflexa, a in der Flächenansicht, b in der Seitenansicht. P irisierende Plasmaplatten, c Chromatophoren (250). Nach Berthold.

§ 372. Zur *Fixierung* der Plasmaplatten empfiehlt Berthold am meisten konzentrierte *Jodlösung* in Meerwasser (cf. § 301) oder *Osmiumsäure* (cf. § 308). In beiden soll jedoch die Struktur derselben nicht vollständig erhalten bleiben.

Ob übrigens diese Körper, wie neuerdings von Wakker (I, 488) als wahrscheinlich hingestellt wird, mit zu den *Elaioplasten* zu rechnen sind, muss noch durch umfassendere Untersuchungen festgestellt werden.

7. Mikrosomen und Granula.

§ 373. Unter dem Ausdruck *Mikrosomen* werden vielfach alle diejenigen kleinen und meist kugelförmigen Körper zusammengefasst, die sich innerhalb des Cytoplasmas durch abweichende Lichtbrechung von der Grundmasse desselben abheben. Es kann jedoch nicht mehr zweifelhaft erscheinen, dass es sich hier um Körper von sehr verschiedener Zusammensetzung handelt, und es kann also von speciellen Reaktionen der Mikrosomen nicht die Rede sein.

Dahingegen wurde nun von Altmann (I) gezeigt, dass sich im Cytoplasma tierischer Zellen ganz allgemein Körper von bestimmten Reaktionen nachweisen lassen, die dieser Autor als *Granula* bezeichnet und als die Elementarorganismen

der Zelle auffasst. Altmann benutzt zur Darstellung dieser Granula vorwiegend ein aus Osmiumsäure und Kaliumbichromat bestehendes Fixierungsgemisch und die § 345 beschriebene Säurefuchsinfärbung A.

§ 374. In wieweit nun auch dem Cytoplasma der Pflanzenzellen eine ähnliche Granulastruktur zukommt, lässt sich zur Zeit noch nicht angeben. Die diesbezüglichen Untersuchungen des Verf. sind bisher noch nicht zu irgendwie abschliessenden Resultaten gelangt. Dahingegen konnte mit Hilfe der Altmann'schen Methoden der Nachweis geliefert werden, dass im Cytoplasma der Assimilationsgewebezellen gewisse Inhaltskörper sehr verbreitet sind, die mit den Altmann'schen Granulis in vieler Beziehung übereinstimmen und auch zunächst einfach als Granula bezeichnet wurden (cf. Zimmermann, II, 38).

Dieselben sind stets farblos und stellen meist kleine Kugeln dar, die in ausgewachsenen Zellen höchstens etwa die Grösse der Nukleolen besitzen (cf. Fig. 48, g). Ihr chemisches Verhalten spricht dafür, dass sie aus proteïnartigen Stoffen bestehen.

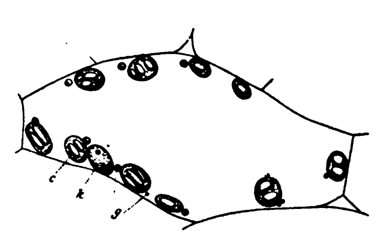


Fig. 48. Zelle aus der untersten Mesophyllschicht von Tradescantia albiflora von einem Präparate, das mit alkoholischer Pikrinsäurelösung fixiert und nach der Altmann'schen Säurefuchsin-Methode gefärbt war. c Chloroplasten, k Zellkern, g Granula.

§ 375. Zur *Fixierung dieser* Granula kann man konzentrierte alkoholische *Sublimat-* oder auch *Pikrinsäurelösung* benutzen (cf. § 310 und 303). Sehr gute Resultate erhielt ich aber namentlich auch mit verdünnter *Salpetersäurelösung*, und zwar verwandte ich in diesem Falle eine Lösung, die auf 97 Volume Wasser drei Volume chemisch reiner Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,3 und somit ca. 1,5 % NO_3H enthielt. Ich liess diese Lösung 24 Stunden einwirken und wusch die betreffenden Objekte sodann 24 Stunden lang in fliessendem Wasser aus.

Zur *Färbung* der Granula habe ich früher fast ausschliesslich die Altmann'sche *Säurefuchsinfärbung* (cf. § 345) benutzt, ich habe mich aber neuerdings davon überzeugt, dass auch die beiden anderen § 346 und 347 angeführten Säurefuchsin-Methoden sehr gute Resultate liefern. Namentlich bei der Fixierung mit

Salpetersäure erhält man verhältnismässig leicht Präparate, in denen die Granula noch intensiv gefärbt sind, während die bedeutend grösseren Chromatophoren bereits völlig entfärbt sind. Als geeignete Versuchsobjekte kann ich z. B. die Blätter von Tradescantia albiflora empfehlen, die namentlich im Schwammparenchym relativ grosse Granula enthalten (cf. Fig. 48, g).

8. Die Cilien.

§ 376. Die Cilien oder Geisseln, welche sich bei den meisten frei beweglichen niederen Organismen vorfinden und stets mit dem Plasmakörper in direkter Verbindung stehen, sind häufig so fein, dass sie namentlich während lebhafter Bewegungen auch bei Anwendung der besten Objektive nur schwer oder überhaupt nicht mit Sicherheit erkannt werden können.

§ 377. In vielen Fällen kann man nun dadurch die Geisseln besser sichtbar machen, dass man die betreffenden Organismen durch schnelle Tödtung zur Ruhe bringt; man benutzt hierzu zweckmässig *Osmiumsäuredämpfe* oder auch 1 % *Osmiumsäure*, 1 % *Chromsäure* oder *Jodjodkaliumlösung*. Ausserdem treten die Cilien auch dann häufig sehr scharf hervor, wenn man den die betreffenden beweglichen Organismen enthaltenden Tropfen einfach auf dem Objektträger eintrocknen lässt.

§ 378. Will man die Stellung der Geisseln während der Bewegung feststellen, so kann man wohl auch nach der von Bütschli (I, 7) vorgeschlagenen Methode der Kulturflüssigkeit feine Carminkörnchen oder dergl. zusetzen, die durch ihre Bewegungen das geisseltragende Ende sichtbar machen.

§ 379. In neuerer Zeit wurden ausserdem namentlich *Färbungsmethoden* zum Nachweis der Cilien benutzt.

So erhielt Migula (I, 76) eine schöne Färbung der Geisseln von Gonium pectorale bei Anwendung folgender Methode: Zu den lebenden Exemplaren wird ein sehr kleiner Tropfen einer konzentrierten alkoholischen *Cyaninlösung* hinzugefügt und nach einiger Zeit soviel Wasser zugesetzt, dass das nicht durch die Organismen aufgenommene Cyanin in Körnchenform ausfällt. Die Geisseln, sowie auch der übrige Plasmakörper färben sich anfangs schwach blau, nach Wasserzusatz tief violett. Uebrigens gab mir diese Methode bei verschiedenen Algen keine günstigen Resultate.

§ 380. Dahingegen habe ich bei Chlamydomonas, Pandorina und Chromophytum nach folgender Methode, die im wesentlichen mit den zur Färbung der Bakteriengeisseln angewandten Methoden übereinstimmt (cf. § 476), eine sehr intensive Färbung der Cilien erhalten: Zunächst wurden die betreffenden Objekte im hängenden Tropfen auf dem Objektträger mit *Osmiumsäuredämpfen* (cf. § 308) fixiert, dann austrocknen gelassen, und darauf ein Tropfen 20% wässeriger *Tanninlösung* zugesetzt, der nach 5 Minuten oder beliebig später mit Wasser abgespült wurde; darauf wurde der Objektträger in konzentrierte wässerige *Fuchsinlösung*[1]) getaucht, in dem er 1/4 Stunde oder beliebig länger verblieb; dann wurde die Fuchsinlösung mit Wasser abgespült, das Präparat wieder austrocknen gelassen und schliesslich ein Tropfen Canadabalsam auf dasselbe gebracht und mit Deckglas bedeckt. Ich erhielt auf diese Weise sehr schön haltbare Dauerpräparate, in denen die Cilien intensiv rot gefärbt waren.

9. Die Proteïnkörner.

§ 381. Die Untersuchung der in den Samen aller höheren Gewächse anzutreffenden Aleuron- oder Proteïnkörner wird bei den ölreichen Samen zweckmässig erst nach der Entfernung dieser der Beobachtung vielfach sehr hinderlichen Oele vorgenommen. Dies kann in vielen Fällen, wie z. B. bei Ricinus, schon dadurch geschehen, dass man Schnitte von den zu untersuchenden Objekten für 5 Minuten oder beliebig länger in absoluten Alkohol bringt; weniger leicht lösliche Fette wird man zweckmässig mit Aether oder einem Gemisch von gleichen Volumen Aether und Alkohol extrahieren. Die weitere Untersuchungsmethode wird sich dann wesentlich danach zu richten haben, welche Bestandteile der Proteïnkörner man in erster Linie sichtbar machen will; denn man unterscheidet an denselben bekanntlich eine *proteïnartige Grundmasse* und verschiedenartige Einschlüsse: *Proteïnkrystalloide, Globoide* und *Calciumoxalatkrystalle*. Es sollen nun im folgenden diese einzelnen Bestandteile, die zwar nicht in allen Proteïnkörnern gleichzeitig angetroffen werden, aber doch sämmt-

---

1) Sehr geeignet ist auch *Carbolfuchsin* (cf. § 468), das in wenigen Minuten eine intensive Färbung bewirkt.

lich eine grosse Verbreitung besitzen, der Reihe nach besprochen werden.

a. Die Grundmasse.

§ 382. Die Grundmasse der Proteïnkörner, die bald die Hauptmasse des ganzen Kornes, bald nur eine dünne Hülle um die verschiedenartigen Einschlüsse desselben bildet, besteht bekanntlich aus Proteïnstoffen und ist auch sehr geeignet als Versuchsobjekt für die §§ 224—234 aufgeführten Proteïnreaktionen. Sie ist ferner stets leicht löslich in verdünnter *Kalilauge* oder *Ammoniaklösung* und in *phosphorsaurem Natron.* Von Lüdtke (I, 73) wird namentlich das letztgenannte Reagenz und zwar in konzentrierter wässeriger Lösung empfohlen.

Im übrigen zeigt die Grundmasse der Proteïnkörner bei den verschiedenen Pflanzen ein sehr verschiedenes Verhalten. Sie ist bei manchen wie z. B. Paeonia löslich in *Wasser,* bei anderen darin unlöslich; ebenso verhält sie sich auch gegen 10% *Kochsalzlösung* und 1% *Natriumkarbonatlösung* je nach der Pflanzenart verschieden. Die in Wasser löslichen Proteïnkörner beobachtet man am besten in *Alkohol* oder *Glycerin*, bei allmählichem Wasserzutritt kann man dann auch leicht die Lösung direkt unter dem Mikroskop beobachten.

§ 383. Natürlich kann man aber die Proteïnkörner auch durch die bekannten *Fixierungsmittel* unlöslich machen, so z. B. mit alkoholischer *Sublimat-* oder *Pikrinsäurelösung.* Die in der letzten Flüssigkeit fixierten Objekte können dann auch direkt in Canadabalsam konserviert werden. Uebrigens gelingt es auch leicht, die Proteïnkörner nach dem Auswaschen des Fixierungsmittels zu *färben,* sehr geeignet ist hierzu z. B. eine wässerige *Eosinlösung.*

§ 384. Nach aussen sowohl als auch gegen die Einschlüsse ist die Grundmasse der Proteïnkörner durch ein zartes *Häutchen* abgegrenzt, das sich durch seine Unlöslichkeit in verdünnten *Alkalien* und *Säuren* von der übrigen Substanz des Proteïnkornes unterscheidet, wie aber bereits von Pfeffer (I, 449) nachgewiesen wurde, ebenfalls aus eiweissartigen Stoffen besteht. Man kann dasselbe nach Pfeffer sehr gut beobachten, wenn man die Grundmasse oder die Einschlüsse durch Zusatz von sehr verdünnter *Kalilauge, Essigsäure* oder *Salzsäure* ganz allmählich auflöst. Von Lüdtke (I, 71) wurde neuerdings *Kalkwasser* zu dem gleichen

Zwecke empfohlen, das die Grundmasse des Proteïnkornes zuerst lösen soll, während die Membran desselben zunächst scharf sichtbar werden und dann nach vorherigem Aufquellen in Lösung gebracht werden soll.

b. Die Proteïnkrystalloide.

§ 385. Die in den Proteïnkörnern vieler Samen beobachteten Krystalloide bestehen wie die Grundmasse selbst stets aus Proteïnstoffen, wie mit Hilfe der § 224—234 aufgezählten Proteïnreaktionen leicht nachgewiesen werden kann. Bei der Beobachtung in *Alkohol* oder *Glycerin* heben sie sich gegen die Grundmasse meist gar nicht oder sehr wenig ab, da sie mit dieser nahezu den gleichen Brechungsindex besitzen (Fig. 49, II, a). Nach der Uebertragung in Wasser, in dem die Krystalloide stets unlöslich sind, treten sie aber infolge ihrer grösseren Dichtigkeit stets deutlich hervor (cf. Fig. 49, II, b). Zur Unterscheidung von den Globoiden und Calciumoxalatkrystallen kann ihre leichte Löslichkeit in sehr verdünnter *Kalilauge* und ihre Fähigkeit, sich in *Jodjodkaliumlösung* je nach der Concentration derselben gelb bis braun zu färben, dienen.

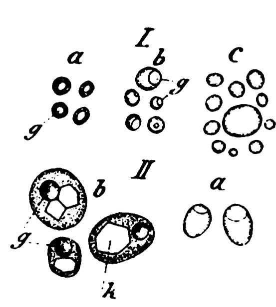


Fig. 49. I. Proteïnkörner von Paeonia, a aus den äusseren, b aus den mittleren, c aus den inneren Schichten. Nach Pikrinsäure-Material gezeichnet. II. Proteïnkörner aus dem Endosperm von Ricinus communis, a in Alkohol, b auf Zusatz von Jodjodkaliumlösung nach der Behandlung mit Alkohol; k Krystalloid, g Globoid.

Von Lüdtke (I, 77) wurde neuerdings auch eine konzentrierte wässerige Lösung von *Natriumphosphat* zum Nachweis der Krystalloide empfohlen, in der dieselben stets völlig unlöslich sind, während alle übrigen Bestandteile des Proteïnkornes — zum Teil allerdings erst nach mehreren Stunden — von dem genannten Reagenz aufgelöst werden.

Die mit deutlichen Flächen versehenen Krystalloide gehören nach Schimper (I) teils dem regulären, teils dem hexagonalen *Krystallsystem* an (cf. Fig. 46, II, a und Fig. 47, II und III); die letzteren besitzen eine schwache Doppelbrechung.

§ 386. Zur Färbung der fixierten Krystalloide ist *Eosin* sehr geeignet. Zu dem gleichen Zwecke kann aber ausserdem auch *Säurefuchsin* unter Anwendung einer der § 345—347 angeführten

Methoden benutzt werden. Dieselben geben namentlich nach der Fixierung mit *Sublimat* eine sehr reine und intensive Färbung der Krystalloide.

§ 387. In neuerer Zeit wurden auch von Overton (II, 5) und Poulsen (II) Methoden zur Färbung der Krystalloide angegeben. Overton bringt die mit *Alkohol*, gehärteten Schnitte durch das Endosperm von Ricinus zunächst für 10 Minuten in eine verdünnte wässerige Lösung von *Tannin* und nach sorgfältigem Auswaschen in 2% *Osmiumsäure*. Durch diese werden die Krystalloide schön braun gefärbt. Die Präparate lassen sich nach dem Auswaschen der Osmiumsäure in Glycerin konservieren.

Poulsen (II, 548) bringt die Schnitte zunächst 24 Stunden in *Alkohol*, dann 1 Stunde in eine 25% wässerige *Tanninlösung* und nach dem Auswaschen durch Wasser in eine wässerige Lösung von *Kaliumbichromat*, in der er sie verweilen lässt, bis sie braun oder gelblich geworden sind. Zur Aufbewahrung dieser Präparate, in denen die Aleuronkörner ganz durchsichtig sein sollen, empfiehlt Poulsen Glycerin.

Nach einer weiteren ebenfalls von Poulsen empfohlenen Methode werden die in gleicher Weise mit *Alkohol* und *Tannin* behandelten Schnitte nach dem Auswaschen eine Stunde lang in eine 10—20% wässerige Lösung von *Eisenvitriol* gebracht. Die Präparate werden darauf ausgewaschen und in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam übertragen. Die Krystalloide erscheinen dann tiefblau, fast schwarz.

c. Die Globoide.

§ 388. Die Globoide bestehen bekanntlich nach den Untersuchungen von Pfeffer (I, 472) aus dem Calcium- und Magnesiumsalz einer gepaarten Phosphorsäure mit organischem Paarling. Sie finden sich zwar nicht in allen Proteïnkörnern, sollen aber nach den Untersuchungen von Pfeffer in keinem Samen ganz fehlen. Ihrer Gestalt nach sind sie bald mehr oder weniger genau kugelförmig, wie z. B. bei Paeonia und Ricinus (cf. g Fig. 49 I und II g), bald unregelmässiger, biscuit- oder traubenförmig, wie bei Bertholletia excelsa (Fig. 50, 1). Ihre relative und absolute Grösse kann innerhalb ein und desselben Samens sehr verschieden sein. So sind z. B. im Endosperm von Paeonia die Proteïnkörner in den innersten Schichten ganz frei von Glo-

boiden, während die Grösse der Letzteren nach aussen zu immer mehr zunimmt (cf. Fig. 49, I a—c).

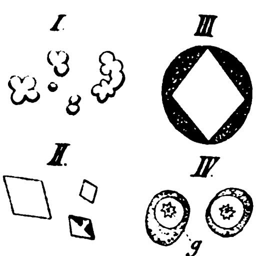


Fig. 50. I. Globoide, II. Krystalloide von Bertholletia excelsa. III. Proteïnkorn von Elaeis guineensis. IV. Proteïnkörner von Vitis vinifera, g Globoid mit Calciumoxalatkrystall in der Mitte.

§ 389. In Oel oder Canadabalsam haben die Globoide das Aussehen von Vakuolen (Fig. 49, 2, a), weil sie einen geringeren Brechungsindex wie dieses besitzen. Sie lassen sich am besten beobachten, wenn man an Schnitten, die mit Alkohol oder Aetheralkohol entfettet sind, mit verdünnter, etwa 1 % *Kalilauge* die Grundmasse des Proteïnkornes und eventuell auch die in dieser enthaltenen Krystalloide in Lösung bringt. Es bleiben dann in dem früher von dem Proteïnkorne eingenommenen Raume nur die Globoide und etwa vorhandene Calciumoxalatkrystalle zurück. Zur Unterscheidung dieser beiden Stoffe kann man sich zweckmässig des *polarisierten Lichtes* bedienen; die Globoide sind nämlich amorph und folglich isotrop, während die Calciumoxalatkrystalle (s. § 392) stark doppelbrechend sind.

Zu dem gleichen Zwecke kann auch *verdünnte,* etwa 1 % *Essigsäure* dienen, in der die Krystalle von oxalsaurem Kalk unlöslich sind, während die Globoide von derselben leicht gelöst werden; in *konzentrierter* Essigsäure sind die Globoide dagegen bedeutend schwerer löslich.

In konzentrierter wässeriger Lösung von *Natriumphosphat* sind die Globoide auch nach vorheriger Behandlung mit Sublimat nach Lüdtke (I, 79) völlig löslich. Doch dauert diese Lösung meist mehrere Stunden, und es zeigen die grösseren Globoide, z. B. aus dem Samen von Vitis vinifera, während derselben eine deutliche *Schichtung,* die allmählich von aussen nach innen vordringt. Aehnliche Schichtungen beobachtete Lüdtke übrigens auch, wenn er verdünnte *Kalilauge* oder *Kalkwasser* längere Zeit auf die Globoide einwirken liess.

Es mag noch an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass die Globoide auch von *Pikrinsäure* gelöst werden. Die Proteïnkörner behalten dennoch in dieser Flüssigkeit völlig ihre frühere Gestalt, und es sind in ihnen Löcher sichtbar, die genau die Form der gelösten Globoide besitzen.

§ 390. Zum Nachweis der chemischen Zusammensetzung

der Globoide wurden von Pfeffer (I, 472) folgende Reaktionen benutzt. Die Gegenwart von *organischer Substanz* in den Globoiden folgt aus der Thatsache, dass auch isolierte Globoide sich beim *Glühen* stark schwärzen; man erhält dieselben leicht, wenn man Schnitte, die durch successives Behandeln mit Aether-Alkohol, 1% Kalilauge und Wasser von Fett und Proteïnstoffen befreit sind, auf dem Deckglase hin und herbewegt. Um eine völlig weisse Asche aus den Globoiden zu erhalten, ist ein sehr starkes Glühen erforderlich.

Wurde nun der bei starkem Glühen restierende Rückstand mit ammoniakalischer *Chlorammoniumlösung* behandelt, so bildeten sich die charakteristischen Krystalle von phosphorsaurer Ammonmagnesia; hieraus folgt gleichzeitig die Anwesenheit von Phosphorsäure und Magnesia in den Globoiden.

Wurden dagegen die Globoide vor dem Glühen mit ammoniakalischer Chlorammoniumlösung behandelt, so findet keine Bildung von Krystallen der phosphorsauren Ammonmagnesia statt, offenbar weil die gepaarte Phosphorsäure sich anders verhält als die durch das Glühen frei gemachte Phosphorsäure. Dahingegen findet die Bildung reichlicher Krystallmengen von dem erwähnten Doppelsalze statt, wenn Schnitte, die in der angegebenen Weise von Fett und Proteïnstoffen befreit waren, mit einem Gemisch von ammoniakalischer Lösung von Chlorammonium und phosphorsaurem Natron behandelt wurden. Ich benutzte in diesem Falle mit gutem Erfolge ein Reagenz, das auf 100 Teile Wasser 10 Teile von den beiden genannten Salzen und 10 Teile der offizinellen Ammoniaklösung enthielt.

§ 391. Die Gegenwart von *Calcium* wurde von Pfeffer (I, 473) durch Zusatz einer ammoniakalischen Lösung von *Chlorammonium* und *oxalsaurem Ammonium* zu den unveränderten Globoiden nachgewiesen, es bildeten sich dann ganz allmählich die charakteristischen Calciumoxalat-Krystalle. Durch Zusatz von *Schwefelsäure* konnte ferner die Entstehung der charakteristischen Gypsnadeln bewirkt werden.

d. Krystalle.

§ 392. Die innerhalb der Proteïnkörner beobachteten Krystalle bestehen wie fast alle innerhalb des pflanzlichen Organismus beobachteten Krystalle aus Calciumoxalat. Bezüglich der Reaktionen desselben vergl. § 85—88. Erwähnt sei an dieser

Stelle nur noch, dass Calciumoxalat-Krystalle auch im Inneren der Globoide auftreten können, so z. B. innerhalb der grossen Proteïnkörner des Samens von Vitis vinifera (cf. Fig. 49, IV, g).

10. Die Proteïnkrystalloïde.

§ 393. Die im Cytoplasma oder im Zellsaft enthaltenen Proteïn-Krystalloide stimmen im wesentlichen mit den innerhalb des Zellkernes, der Chromatophoren und Proteïnkörner enthaltenen Krystalloiden (cf. § 343, 359 u. 385) überein. Neben sehr regelmässig ausgebildeten Formen, wie z. B. denen aus den Knollen von Solanum tuberosum (Fig. 38, k), oder aus der Blattepidermis von Polypodium irreoides (Fig. 51, I k), findet man namentlich auch spindel- oder nadelförmige Gestalten (Fig. 51, II—IV) oder solche

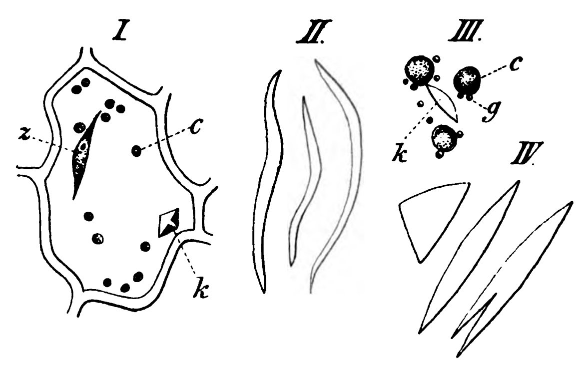


Fig 51. I. Epidermiszelle der Blattunterseite von Polypodium irreoides. k Krystalloid, z Zellkern, c Chloroplasten. II. Krystalloide aus der Fruchtknotenwandung von Gratiola officinalis. III. Krystalloid (k), Chloroplasten (c) und Granula (g) aus einer Schwammparenchymzelle von Passiflora coerulea. IV. Krystalloide aus dem subepidermalen Parenchym des Blattes von Vanda furva.

die in verschiedener Weise gekrümmt sind. Von Molisch (II) wurden im Blatt verschiedener Epiphyllum spec. sogar völlig ringförmige Krystalloide beobachtet.

Zum Nachweis dieser Krystalloide bedient man sich ausser der Beobachtung des lebenden Materiales am zweckmässigsten der § 345—347 angeführten Tinktions-Methoden.

§ 394. Wie namentlich von J. Klein (I) nachgewiesen wurde, kommen übrigens auch bei zahlreichen Meeresalgen echte Proteïnkrystalloide vor. Dieselben sind aber nicht zu verwechseln mit den sogenannten *Rhodosperminkrystalloiden*, die erst beim Tödten der betreffenden Algen in Kochsalzlösung oder Weingeist entstehen.

§ 395. Das *Rhodospermin* besteht vorwiegend aus hexagonalen Prismen oder Tafeln, die intensiv rot gefärbt sind (Fig. 52). Dieselben sind unlöslich in *Wasser*, *Alkohol, Glycerin, Schwefelsäure, Salpetersäure, Salzsäure, Essigsäure* und *Alkalien.* Durch Kochen in *Schwefelsäure, Salzsäure* oder *Kali* werden sie allmählich zerstört und unsichtbar. *Jod* färbt sie erst goldgelb, später intensiv braungelb. Durch konzentrierte *Salpetersäure* werden sie nicht gefärbt, bei nachherigem Zusatz von *Ammoniak* aber aufs deutlichste gelb. In *Kalilösung* quillt das Rhodospermin oft beträchtlich auf, auf Zusatz von Säuren kontrahiert es sich aber wieder auf das ursprüngliche Volum, indem gleichzeitig die im Kali verschwundene Färbung wieder erscheint (cf. J. Klein I, 55).

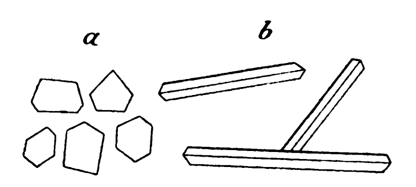


Fig. 52. Rhodosperminkrystalle von Ceramium rubrum. a im Rindengewebe gebildet. b Frei in der Flüssigkeit ausgebildetes Rhodospermin. Nach J. Klein.

Ob wir auf Grund dieser Reaktionen berechtigt sind, das Rhodospermin, wie es gewöhnlich geschieht, zu den Proteïnstoffen zu rechnen, scheint mir zum mindesten zweifelhaft. Jedenfalls gehören aber die Rhodosperminkrystalloide nicht in dieselbe Kategorie wie die anderen Krystalloide, denn sie stellen, wie bereits bemerkt wurde, ein erst durch Reagentienwirkung entstandenes Kunstprodukt dar.

11. Rhabdoiden (Plastoiden).

§ 396. In den meisten Epidermiszellen von Drosera dichotoma, sowie denen von Dionaea beobachtete Gardiner (I) spindel- oder nadelförmig gestaltete Körper, die er zunächst als *Plastoiden,* später als *Rhabdoiden* [1]) bezeichnete. Dieselben finden sich meist in Einzahl in den betreffenden Zellen, die sie diagonal durchsetzen. Sie werden fixiert durch *Alkohol, Chromsäure* und *Pikrinsäure.* Nach der Fixierung mit der letztgenannten Säure sollen sie sich mit Hoffmann's *Blau* intensiv färben lassen; in verdünntem Alkohol sollen sie dagegen verquellen und schliesslich ganz verschwinden. Auch durch *Jod* sollen sie desorganisiert werden und eine sphaerische Gestalt erhalten.

1) Von ἡ ῥάβδος der Stab.

Nach der Reizung der Blätter sollen sich die Rhabdoiden zusammenziehen und abrunden oder auch wohl in mehrere Stücke zerfallen, die zunächst linsenförmig, später immer mehr kugelförmig werden.

Nach längerer Reizung sollen die Rhabdoiden merklich an Grösse abnehmen; sie werden deshalb von Gardiner für Reservestoffe gehalten.

Ob diese Gebilde einfach zu den Krystalloiden zu rechnen sind, ist nach den vorliegenden Untersuchungen nicht zu entscheiden.

12. Die Stachelkugeln oder Wimperkörper der Characeen.

§ 397. Die in den Zellen verschiedener Nitella sp. beobachteten Stachelkugeln oder Wimperkörper haben bereits eine sehr verschiedenartige Deutung erfahren (cf. Zimmermann I, 73). Nach neueren Untersuchungen von Overton (II) bestehen dieselben aus *Eiweissstoffen,* die höchst wahrscheinlich eine krystallinische Struktur besitzen und zum Teil mit *Gerbstoffen* verbunden sind.

§ 398. Zur Nachweisung des *Gerbstoff*gehaltes der Stachelkörper benutzte Overton: *Kaliumbichromat, Osmiumsäure* und die Lebendfärbung mit *Methylenblau* (cf. § 201, 203 und 208). Die *Proteïnnatur* derselben erschloss er aus dem Verhalten gegen *Jodjodkalium,* Raspail'sches Reagenz und das Hartig'sche *Blutlaugensalz-Eisenchlorid*-Reagenz (cf. § 224, 227 u. 230). Ausserdem färbte er mit alkoholischer *Sublimatlösung* fixierte Objekte mit *Boraxcarmin* und wässeriger *Fuchsinlösung.* Bei Anwendung des ersteren und Einbettung in Tolubalsam soll die krystallinische Struktur der Stachelkugeln am besten hervortreten.

Bemerkenswert bleibt immerhin die schwere Löslichkeit der Stachelkugeln in Säuren und Alkalien. Die genannten Körper bleiben nämlich nach den Untersuchungen von Overton (II, 4) fast unverändert in conc. *Schwefelsäure, Salzsäure, Salpetersäure* und in *Eisessig.* Auch kalte *Natronlauge* greift sie nicht an, während beim Kochen in dieser Lösung die Stachelhülle allmählich verschwindet und das Innere eine schwammige Struktur annimmt.

§ 399. Erwähnen will ich ferner noch, dass Overton in den Zellen von Nitella syncarpa ausser jenen Stachelkugeln noch wasserhelle Blasen aufgefunden hat, die ganz das gleiche che-

mische Verhalten zeigten, wie die Stachelkugeln und dass auch Uebergänge zwischen diesen beiden Körpern aufzufinden waren. Innerhalb der untersuchten Chara spec. fand Overton nur solche stachellose Körper; dieselben sind höchst wahrscheinlich identisch mit den vom Verf. nach der Fixierung mit Salpetersäure und Färbung mit Säurefuchsin in den Zellen einer nicht näher bestimmten Chara spec. nachgewiesenen stark tinctionsfähigen Körpern (cf. Zimmermann II, 51).

13. Die Stärkekörner und verwandte Körper.

a. Stärke.

§ 400. Die *chemische Zusammensetzung* der Stärke entspricht bekanntlich der Formel $C_6 H_{10} O_5$; es ist jedoch noch unentschieden, ob wir es in den Stärkekörnern mit einer völlig einheitlichen Verbindung zu thun haben.

Die *Gestalt der Stärkekörner* zeigt bei den verschiedenen Pflanzen eine sehr grosse Mannigfaltigkeit. In dem nämlichen Organ ein und derselben Pflanzenart werden jedoch abgesehen

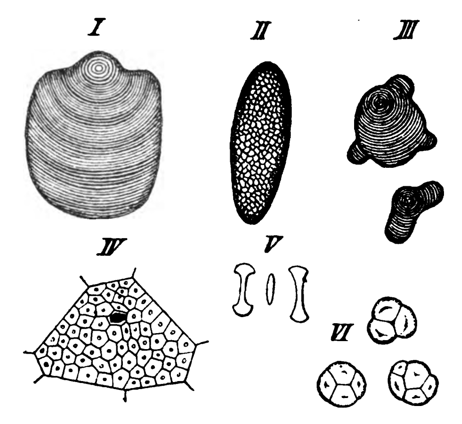


Fig. 53. I. Stärkekorn aus der Knolle von Canna indica (300). II. Id. aus dem Samen von Beta vulgaris (500). III. Id. aus den Schuppen von Lathraea squamaria (150). IV. Endospermzelle von Zea Mays. V. Stärkekörner aus dem Milchsaft von Euphorbia splendens (150). VI. Id. aus der Sassaparillwurzel (250).

von den verschiedenen Entwicklungstadien meist nur geringe und innerhalb ganz bestimmter Grenzen liegende Schwankungen beobachtet. Einige der charakteristischsten Formen der Stärkekörner sind in Fig. 53 zusammengestellt. Auf derselben stellen Fig. I, III u. V einfache Stärkekörner von Canna, Lathraea und

Euphorbia dar. Die letzteren beiden Arten sind namentlich durch eigentümliche Gestalt ausgezeichnet. In Fig. IV ist sodann eine Zelle aus dem hornartigen Teile des Endosperms von Zea Mays dargestellt, in dem die Stärkekörner einander fast bis zur Berührung genähert sind. Fig. II und IV stellen endlich sogenannte *zusammengesetzte* Stärkekörner von Chenopodium und Smilax dar. Die ersteren bestehen aus einer ungeheuer grossen Zahl von »*Teilkörnern.*«

§ 401. Die grösseren Stärkekörner zeigen meist eine mehr oder weniger deutliche *Schichtung*, die sicher auf verschiedenem Wassergehalt beruht. Man kann sich hievon namentlich dadurch überzeugen, dass man feuchte und ausgetrocknete Stärkekörner in Canadabalsam oder dergl. untersucht (cf. § 297k und Zimmermann I, 87). Auch die § 297n beschriebene *Versilberung* lässt sich, wie Correns (III, 331) gezeigt hat, bei den Stärkekörnern ausführen. Man verfährt dann am zweckmässigsten in der Weise, dass man die durch Schaben isolierten und in einem Becherglase durch Auswaschen und Dekantieren gereinigten Stärkekörner bei c. 50° C austrocknet, dann mit wenigen Tropfen 5% Silbernitratlösung übergiesst, darauf eine grosse Menge 10% Kochsalzlösung zusetzt und bis zur Vollendung der Reduktion möglichst intensiv beleuchtet. Schliesslich werden dann die Stärkekörner auf dem Objektträger wiederum getrocknet und in Canadabalsam eingeschlossen. Man beobachtet dann bei den meisten einigermassen grossen Körnern innerhalb der stärker quellungsfähigen Schichten zahlreiche ausgeschiedene Silberkörnchen.

§ 402. Im *polarisierten Lichte* geben die Stärkekörner ein entsprechendes Bild, wie Sphaerokrystalle; doch ist die Orientierung der optischen Axen entgegengesetzt wie z. B. bei den Sphaeriten des Inulins. Bei den excentrisch gebauten Stärkekörnern liegt der Schnittpunkt des schwarzen Kreuzes ebenfalls excentrisch und fällt stets mit dem Schichtencentrum zusammen.

§ 403. Bezüglich des *mikrochemischen Verhaltens* der Stärke sei zunächst erwähnt, dass dieselbe in kaltem *Wasser* völlig unlöslich ist; in heissem Wasser erleidet sie aber zunächst starke Quellung, bei längerem Kochen wird sie vollständig in Lösung übergeführt (*Kleister*). Ebenso bewirkt auch *Kalilauge* eine starke Quellung und schliesslich eine vollständige Lösung der Stärkekörner.

Besonders charakteristisch für die Stärke ist jedoch die Blaufärbung durch *Jod.* Dieselbe tritt nun aber keineswegs mit jeder

beliebigen Jodlösung ein, besonders geben alle Jodwasserstoffsäure oder Jodkalium-haltigen Lösungen mehr violettbraune Farbentöne. Eine reine blaue Färbung der Stärkekörner erhält man dagegen, wenn man sich unmittelbar vor dem Gebrauch eine wässerige Jodlösung in der Weise darstellt, dass man einige Tropfen einer alkoholischen Jodlösung, die selbst beliebig alt sein kann, in einige cm destillierten Wassers giesst. Jedenfalls ist aber stets die Anwendung verdünnter Lösungen zur Färbung der Stärkekörner zweckmässig, da sich dieselben in konzentrierten Lösungen sofort dunkelschwarz färben.

Ebenso wie die unversehrten Stärkekörner haben auch die gequollenen, sowie der Kleister, die Fähigkeit, sich mit Jod blau zu färben; diese Färbung verschwindet jedoch beim *Erwärmen,* erscheint aber beim nachherigen Erkalten auch ohne abermaligen Jodzusatz von Neuem. Durch *Kalilauge* wird die Jodfärbung durch Zersetzung des Jods stets sofort völlig aufgehoben.

§ 404. Zum *Nachweis sehr geringer Stärkemengen* hat man bereits verschiedene Methoden angegeben, die im wesentlichen eine Quellung der Stärkekörner vor dem Jodzusatz und eine Zerstörung des übrigen Zellinhaltes bezwecken. Immerhin wird man in den meisten Fällen doch gut thun, zarte Schnitte von dem zu untersuchenden Objekte in konzentrierte Jodjodkaliumlösung zu bringen; es treten dann bei starker Vergrösserung und grossem Beleuchtungskegel die intensiv schwarzen Stärkekörner sehr scharf hervor.

§ 405. In vielen Fällen wird man aber auch zweckmässig nach der von A. Meyer (II) angegebenen Methode auf die mit ziemlich verdünnter Jodjodkaliumlösung behandelten Schnitte nach dem Absaugen dieses Reagenz konzentrierte wässerige *Chloralhydratlösung* einwirken lassen, die unter gleichzeitiger Zerstörung der übrigen Zellbestandteile die Stärkekörner zur Quellung bringt, so dass dieselben dann heller und meist schön blau gefärbt erscheinen. Uebrigens ist hervorzuheben, dass durch das Chloralhydrat auch die Stärke schliesslich zersetzt wird und dass sehr geringe Stärkemengen, die natürlich zuerst angegriffen werden, leicht übersehen werden können, wenn man die Schnitte nicht sehr bald nach dem Zusatz des Chloralhydrats durchmustert.

Durch Erhitzen lässt sich die Wirkung des Chloralhydrats noch beschleunigen; die durch Jod bewirkte Färbung der Stärke-

körner verschwindet dann, um erst nach dem Erkalten wieder zu erscheinen.

In ähnlicher Weise wie Chloralhydrat wirkt auch die von Heinricher (I) zum Stärkenachweis empfohlene *Eau de Javelle* (cf. § 12, 4). Doch ist es nach den Angaben dieses Autors zweckmässiger, die zu untersuchenden Objekte schon vor dem Jodzusatz mit Eau de Javelle zu behandeln, da das Jod sonst die Zerstörung des Plasmas beeinträchtigen würde.

Beide Mittel, Chloralhydrat und Eau de Javelle werden auch mit Vorteil angewandt, wenn es sich darum handelt, in *grösseren Organen* wie z. B. ganzen Blättern die Verteilung der Stärke zu demonstrieren. Man verfährt in diesem Falle wohl am zweckmässigsten in der Weise, dass man die zu untersuchenden Objekte direkt in eine konzentrierte Jod-haltige Chloralhydratlösung einträgt und diese zum Sieden erhitzt; man kann auf diese Weise einigermassen zarte Blätter in wenigen Minuten aufhellen und mit Jod durcktränken.

§ 406. Mit grosser Sicherheit lässt sich der Stärkenachweis bei *Mikrotomschnitten* ausführen. Man benutzt zu diesem Zwecke am besten eine sehr konzentrierte Jodjodkaliumlösung, die auch die kleinsten Stärkekörner dunkel violett oder vollständig schwarz färbt. Dieselben heben sich dann auch in sehr plasmareichen Zellen scharf von den braun gefärbten Proteïnstoffen ab. In zweifelhaften Fällen kann man übrigens nachträglich noch konzentrierte Chloralhydratlösung zusetzen, in der sich die Stärkekörner unter starker Quellung schön blau färben, während der übrige Zellinhalt eine weitgehende Zerstörung erfährt.

§ 407. Erwähnen will ich an dieser Stelle noch, dass nicht alle Stärkekörner durch Jod blau gefärbt werden. Vielmehr gibt es auch solche, die sich mit Jod entweder ganz oder zum Teil *rot* färben oder intermediäre Farbentöne zwischen rot und blau annehmen. Nach den Untersuchungen von Shimoyama (I) und A. Meyer (I) ist es wahrscheinlich, dass das abweichende Verhalten dieser Stärkekörner dadurch hervorgebracht wird, dass dieselben ausser echter Stärkesubstanz mehr oder weniger grosse Mengen von *Amylodextrin* und *Dextrin* enthalten.

Das Amylodextrin ist in kaltem Wasser fast unlöslich, dagegen wird es durch Wasser von 60° C. leicht gelöst und aus einer solchen Lösung beim Erkalten nicht wieder ausgeschieden. Beim Abdampfen oder Gefrieren der Lösung scheidet sich aber

das Amylodextrin aus dieser in Form eigentümlicher krystallinischer Scheibchen, sogenannter »Discokrystalle«, ab (cf. W. Naegeli (I) und Naegeli und Schwendener (I, 359).

§ 408. Das *Amylodextrin* entsteht auch als Zwischenprodukt bei der Verwandlung der Stärke in Dextrin und Maltose. Werden Stärkekörner in Speichelferment längere Zeit auf ca. 50^0 erhitzt, so verlieren diese meist schon nach wenigen Stunden die Fähigkeit, sich mit Jod blau zu färben und nehmen mit diesem Reagenz je nach der Dauer der Einwirkung eine violette, weinrote und schliesslich rein gelbe Färbung an. Trotzdem besitzen die restierenden Körner, die sogenannten »*Stärkeskelette*« noch vollständig die Gestalt der ursprünglichen Stärkekörner und zeigen oft auch deutliche Schichtung. Derartige aus Amylodextrin bestehende Stärkeskelette können auch durch jahrelange Einwirkung von verdünnter Salz- oder Schwefelsäure auf die unveränderte Stärke erhalten werden.

§ 409. In anderer Weise vollzieht sich dagegen die *Auflösung der Stärke innerhalb der lebenden Pflanze.* Wie neuerdings von Krabbe (I) ausführlich beschrieben wurde, findet hier entweder eine gleichmässige Lösung von aussen nach innen statt, oder es bilden sich lokale Corrosionen in Form von gruben- oder kraterförmigen Einsenkungen. Bei kleinen Körnern bilden sich auch häufig Porenkanäle, die sich nach dem Inneren des Kornes zu verlängern und dabei oft zur Bildung eines centralen Hohlraumes führen.

In entsprechender Weise wirkt auch das *Diastaseferment.* Man kann sich dasselbe z. B. durch Auflösen von Malzextrakt in Wasser bereiten. Eine sehr geeignete fermentativ wirkende Flüssigkeit erhält man auch, wenn man zu der wässerigen Lösung der käuflichen Diastase c. 0,05 % Citronensäure setzt (cf. Detmer I, 197).

§ 410. Erwähnt werden mag an dieser Stelle schliesslich noch eine gewöhnlich als *lösliche oder formlose Stärke* bezeichnete Substanz, die mit der echten Stärke darin übereinstimmt, dass sie sich mit Jodlösungen blau oder violett bis rot färbt. Dieselbe ist aber löslich in Wasser und findet sich nur innerhalb des Zellsaftes der Epidermiszellen einiger weniger Gewächse, z. B. Saponaria officinalis. Ueber ihre chemische Zusammensetzung lassen sich zur Zeit noch keine sicheren Angaben machen (cf. J. Dufour, II).

b. Florideenstärke.

§ 411. In den Zellen der Florideen wurden farblose Körnchen beobachtet, die wie van Tieghem (I, 804) nachgewiesen hat, in ihren meisten chemischen Eigenschaften, namentlich in ihrem Verhalten gegen Kalilauge und heisses Wasser, mit der gewöhnlichen Stärke übereinstimmen, und auch im Polarisationsmikroskop ein gleich orientiertes Kreuz wie diese zeigen. Mit Jod nehmen aber diese Körnchen, die man gewöhnlich als Florideen- oder Rhodophyceenstärke bezeichnet, meist nur eine gelbbraune bis braunrote Färbung an. Nach neueren Untersuchungen von Belzung (I, 224) sollen sich allerdings auch bei manchen Florideen namentlich die jugendlichen Stärkekörner mit Jod blau färben. Eine genauere chemische Untersuchung über die Substanz der Florideenstärke fehlt zur Zeit noch.

c. Phaeophyceenstärke.

§ 412. Von Schmitz (I, 154 und II, 60) wurden im Cytoplasma der Phaeophyceen farblose Körnchen beobachtet, die in Wasser ganz unlöslich sein, sich mit Jod aber gar nicht färben sollen. Von Berthold (I, 57) wurde das Vorkommen derartiger Körper bestritten.

d. Paramylon.

§ 413. Die im Cytoplasma der Euglenen und von Zopf (I, 17) auch in den Amoeben und Cysten von Leptophrys vorax nachgewiesenen Paramylonkörner haben meist eine scheibenförmige oder stabförmige Gestalt (cf. Fig. 54, I); doch wurden auch ringförmige Paramylonkörner beobachtet (cf. Fig. 54, II u. III).

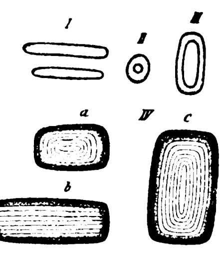


Fig. 54. Paramylonkörner. I. Von Euglena acus. II. Von Phacus parvula. III. Von Euglena Spirogyra. IV. a—c Von Euglena Ehrenbergii von 3 Seiten aus gesehen (400). Nach Klebs.

Bei den grossen Paramylonkörnern von Euglena Ehrenbergii beobachtete Klebs (I, 271) eine deutliche *Schichtung*, die jedoch in ihrem Verlauf sehr eigentümlich ist und von der der Stärkekörner bedeutend abweicht. Die genannten Paramylonkörner bestehen nämlich, wie aus Fig. 54, IV, a—c, die ein solches Korn in den drei verschiedenen Ansichten darstellt, ersichtlich ist, aus aufein-

anderliegenden Platten, die selbst aus konzentrierten Ringen zusammengesetzt sind. Es fehlt somit dem ganzen Korn an einem gemeinsamen Schichtenzentrum.

Bei anderen Paramylonkörnern konnte Klebs die Schichtung nur durch Quellungsmittel sichtbar machen.

In chemischer Hinsicht unterscheiden sich die Paramylonkörner von den Stärkekörnern dadurch, dass sie durch *Jodlösungen* nicht gefärbt werden und überhaupt nicht tinktionsfähig sind. Ausserdem führt Klebs (I, 270) als charakteristisch für dieselben an, dass sie in 5% *Kalilauge* noch ganz unverändert bleiben und nicht aufquellen, während sie sich schon in 6% Kalilauge unter starker Quellung sofort auflösen. Eine genauere chemische Analyse der Paramylonkörner fehlt zur Zeit noch.

e. Cellulinkörner.

§ 414. Die von Pringsheim (I) in den Schläuchen verschiedener Saprolegniaceen entdeckten Cellulinkörner besitzen bald die Gestalt rundlicher oder polyëdrischer Plättchen, bald sind sie mehr kugelförmig und zeigen häufig deutliche Schichtung (cf. Fig. 55). Sie werden durch *Jodlösungen* nicht gefärbt, sind selbst in konzentrierter *Kalilauge* unlöslich, aber löslich in konzentrierter *Schwefelsäure* und *Zinkchloridlösung*. Ueber die chemische Konstitution derselben ist nichts bekannt.

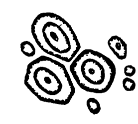


Fig. 55. Cellulinkörner von Apodya lactea. Nach Pringsheim.

f. Fibrosinkörper.

§ 415. Von Zopf (III) wurden in den Conidien von Podosphaera Oxyacanthae und anderen Erysipheen eigenartige Körper aufgefunden, die derselbe als Fibrosinkörper bezeichnet. Dieselben sind stets dem Cytoplasma eingebettet und besitzen eine bald schalenförmige, bald hohlkegel- oder hohlcylinderförmige Gestalt (cf. Fig. 56). Ihr grösster Durchmesser liegt zwischen 2 und 8 μ. Eine *Schichtung* konnte an ihnen selbst nach der Behandlung mit Kalilauge oder Chromsäure nicht beobachtet werden. Zur Beobachtung der Fibrosinkörper empfiehlt Zopf dieselben durch Druck





Fig. 56. Fibrosinkörper aus den Conidien von Podosphaera Oxyacanthae, zum Teil in verschiedenen durch punktierte Linien verbundenen Ansichten dargestellt. 1000. Nach Zopf.

auf das Deckglas zu isolieren oder die Sporen durch Salpetersäure oder Kalilauge durchsichtiger zu machen.

Ueber ihr chemisches Verhalten hat Zopf folgendes festgestellt: Sie verquellen in heissem *Wasser* zu rundlichen Körpern, durch *Jodjodkalium* werden sie ebensowenig gefärbt wie durch *Chlorzinkjod,* durch letzteres Reagenz werden sie auch nicht gelöst; in konzentrierter *Schwefelsäure* sind sie schwer löslich; von *Salpetersäure* werden sie auch nach 48stündiger Einwirkung nicht gelöst; in *Kalilauge* sind sie in der Kälte unlöslich, in der Wärme quellen sie in derselben zu unregelmässigen stark lichtbrechenden Körpern auf; sie sind unlöslich in *Kupferoxydammoniak, Alkohol, Aether* und *Chloroform*, werden durch *Osmiumsäure* nicht gebräunt und speichern keine *Anilinfarbstoffe.*

Die Fibrosinkörper stimmen somit in ihren Reaktionen am meisten mit der *Pilzcellulose* überein, von den *Cellulinkörnern* unterscheiden sie sich namentlich durch die Unlöslichkeit in Chlorzinkjod und durch die schwerere Löslichkeit in konzentrierter Schwefelsäure. Eine makrochemische Analyse derselben konnte aus naheliegenden Gründen bisher nicht ausgeführt werden.

14. Die Schleimkugeln der Cyanophyceen.

§ 416. In den Zellen der Cyanophyceen wurden von verschiedenen Autoren kugelförmige Gebilde beobachtet, die sich stets im peripherischen Teile des Plasmakörpers befinden (Fig. 57, s) und namentlich häufig den Querwänden beiderseits angelagert sind. Dieselben mögen im folgenden mit Schmitz als Schleimkugeln bezeichnet werden, wenn sich auch über die chemische Zusammensetzung derselben zur Zeit noch kein Aufschluss erlangen liess.

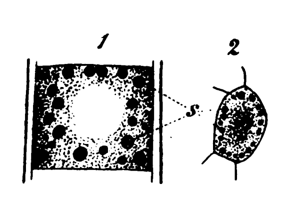


Fig. 57. 1. Lebende Zelle von Scytonema. 2. Zelle von Nostoc, nach der Färbung mit Essigkarmin. s Schleimkugeln. Nach Zacharias.

§ 417. Nach den neueren Untersuchungen von Zacharias (III, p. 12 d. Sep.) geben diese Schleimkugeln folgende Reaktionen. Sie sind unlöslich in *Alkohol* und *Aether,* werden weder durch Kochen in destilliertem *Wasser,* noch durch Zusatz von 1 % *Sodalösung* verändert. In 0,3 % *Salzsäure* verquellen sie und werden unsichtbar, ebenso in einem Gemisch von 2 Volumen konzentrierter *Schwefelsäure* und 3 Volumen Wasser,

während sie in einem Gemisch von 1 Volum Schwefelsäure und 100 Volumen Wasser zwar quellen, aber sichtbar bleiben. 3—5% *Kalilauge* bewirkt Quellung der Schleimkugeln, in 1% Kalilauge bleiben sie dagegen unverändert. In einer mit *Essigsäure* angesäuerten *Blutlaugensalzlösung* treten sie scharf hervor und nehmen eine vakuolige Struktur an. In Millon's Reagenz bleiben sie farblos, ebenso in *Jodglycerin* oder *Chlorzinkjod. Jodjodkalium* und die obengenannte verdünnte *Schwefelsäure* bewirken dagegen eine intensive Braunfärbung der Schleimkugeln. *Essigkarmin* färbt dieselben intensiv rot, ebenso soll sich nach der Behandlung mit Alkohol durch *Alaunkarmin* und Delafield'*sches Haematoxylin* eine intensive Färbung der Schleimkugeln bewirken lassen

Die Färbbarkeit der Schleimkugeln durch *Haematoxylin* wurde übrigens von Bütschli (I, 17) bestritten. Nach den Angaben dieses Autors soll sich namentlich *Eosin* zur Färbung derselben eignen. Die Schleimkugeln sollen sich mit Hilfe dieses Mittels auch an Haematoxylinpräparaten durch nachträgliche Färbung sichtbar machen lassen.

15. Gerbstoffblasen.

§ 418. In den Zellen vieler Zygnemaceen finden sich stark lichtbrechende kugelförmige Gebilde, die, wie Pringsheim (II, 354) nachgewiesen, grosse Gerbstoffmengen enthalten und gewöhnlich als *Gerbstoffblasen* bezeichnet werden. Derartige Gerbstoffblasen sind übrigens auch bei verschiedenen Phanerogamen beobachtet worden (cf. af Klercker I, 15). Während sie jedoch bei den genannten Algen meist in grosser Anzahl vorhanden sind und nur eine geringe Grösse besitzen (cf. g Fig. 58), werden sie bei den Phanerogamen meist in Einzahl oder zu wenigen in jeder Zelle angetroffen und sind auch von einer relativ beträchtlichen Grösse, so z. B. in den Blattstielgelenken von Desmanthus plenus (cf. g Figur 59).

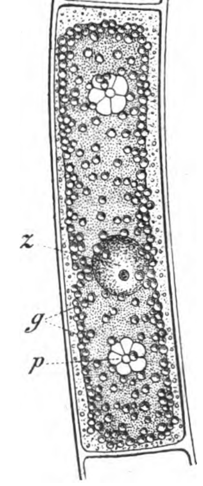


Fig. 58. Zelle von Mesocarpus spec. g Gerbstoffblasen, p Pyrenoid, z Zellkern.

§ 419. Diese Gerbstoffvakuolen entstehen nun, wie Klercker (I, 22) nachgewiesen,

stets im Plasmakörper, gegen den sie höchst wahrscheinlich durch eine echte Niederschlagsmembran aus gerbsaurem Eiweiss abgegrenzt sind. Ob sie ausser dem Gerbstoff noch andere Stoffe enthalten, lässt sich zur Zeit noch nicht mit Sicherheit angeben; jedenfalls ist aber, wie Klercker (I, 36) gezeigt hat, ausgeschlossen, dass in ihnen gelöste Proteïnstoffe enthalten sind.

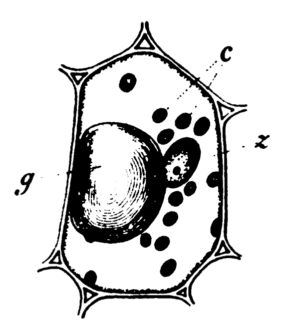


Fig. 59. Zelle aus dem Blattstielgelenk von Desmanthus plenus, g Gerbstoffblase, z Zellkern, c Chloroplasten.

§ 420. Bei der Untersuchung der Gerbstoffblasen können natürlich alle § 199 bis 208 beschriebenen Gerbstoffreaktionen Verwendung finden. Besonders geeignet ist aber die Pfeffer'sche Lebendfärbung mit Methylenblau (§ 208), die namentlich auch bei entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen mit Vorteil zu verwenden ist. Als geeignete Versuchsobjekte können Zygnema und Mesocarpus (cf. Fig. 58), sowie die Zellen aus der Wurzelhaube von Pistia Stratiotes oder aus den Blattstielgelenken von Desmanthus plenus (cf. Fig. 59) empfohlen werden.

§ 421. Eine gute Fixierung dieser Färbung erhielt ich durch Eintragen der gefärbten Objekte in eine konzentrierte wässerige Pikrinsäure-Lösung, in der ich dieselben 2—24 Stunden beliess. Dann schwenkte ich sie wiederholt in reinem Wasser um, brachte sie in 10—20 % Alkohol, den ich allmählich — etwa mit Hilfe des Schulze'schen Entwässerungsgefässes, cf. § 16 — durch absoluten Alkohol ersetzte, übertrug darauf in ein Gemisch von 3 Teilen Xylol und 1 Teil Alkohol, dann in Xylol und schloss schliesslich in Canadabalsam ein [1]). Ich erhielt so schöne Dauerpräparate von Zygnema, in denen noch nach einem halben Jahre allein die Gerbstoffblasen intensiv blau gefärbt waren, während aus den in entsprechender Weise in Glyceringelatine eingeschlossenen Fäden der Farbstoff in dieser Zeit fast völlig ausgezogen war.

Ob eine Lösung von pikrinsaurem Ammon, die nach Dogiel (I) bei tierischen Objekten zur Fixierung der Methylenblaufärbung vor der wässerigen Pikrinsäurelösung den Vorzug verdienen soll,

1) Nelkenöl, Phenol oder Anilin sind bei der Uebertragung in Canadabalsam nicht zu verwenden, da sie die Methylenblaufärbung sofort auswaschen.

auch bei pflanzlichen Präparaten noch bessere Dienste leisten würde, habe ich nicht untersucht.

16. Die Reaktion der verschiedenen Zellbestandteile.

§ 422. Bei zahlreichen Fragen ist es von Interesse zu erfahren, welche *Reaktion* die verschiedenen Zellbestandteile, namentlich das Cytoplasma und der Zellsaft, innerhalb der lebenden Zelle besitzen. Bei der weitgehenden Arbeitsteilung innerhalb des Zellorganismus können nun in dieser Hinsicht die Reaktionen des aus grösseren Pflanzenteilen ausgepressten Saftes nur zu sehr unsicheren Resultaten führen, und ich verzichte deshalb auch darauf, an dieser Stelle auf die in dieser Weise angestellten Beobachtungen näher einzugehen.

§ 423. Was zunächst den *Zellsaft* anlangt, so kann man die Reaktion desselben in denjenigen Fällen, in denen derselbe einen Farbstoff gelöst enthält, der je nach der Reaktion eine andere Färbung zeigt, leicht durch direkte Beobachtung feststellen. Einen solchen Farbstoff stellt aber namentlich das sogenannte *Anthocyan* (cf. § 184) dar, das bei saurer Reaktion rot, bei schwach alkalischer blau und bei stärker alkalischer Reaktion grün bis gelb erscheint. Der Zellsaft wird also z. B. in blaugefärbten Blütenteilen im allgemeinen alkalische oder neutrale, in rot gefärbten dagegen saure Reaktion besitzen müssen. Uebrigens kann auch innerhalb ein und derselben Zelle im Laufe der Entwicklung eine Aenderung der Reaktion eintreten, wie z. B. bei den Blüten von Pulmonaria officinalis, die zuerst rot, dann blau gefärbt erscheinen. Auch lässt sich bei der genannten Pflanze, wie Pfeffer (V, 140) gezeigt hat, jederzeit durch Spuren von Ammoniak eine Blaufärbung der roten Blütenbestandteile bewirken.

§ 424. Bei Zellen mit farblosem Zellsaft kann man nun ferner dadurch über die Reaktion des Zellsaftes Aufschluss erlangen, dass man in dieselben nach der von Pfeffer vorgeschlagenen Methode künstlich Farbstoffe einführt, die ebenfalls je nach der Reaktion eine verschiedene Färbung zeigen. Sehr geeignet ist zu diesem Zwecke nach Pfeffer (II, 266) namentlich *Methylorange*, dessen orangegelbe Färbung durch verdünnte Alkalien nicht verändert wird. Pfeffer verwandte bei seinen Versuchen eine 0,01 % Lösung. Ausserdem hat Pfeffer (II, 259 u. 267) auch mit *Cyanin*, *Tropaeolin* und *Corallin* einige Versuche ange-

stellt; diese Farbstoffe haben sich aber als weniger brauchbar erwiesen.

§ 425. Schwieriger ist es in den meisten Fällen, die *Reaktion des Plasmakörpers* festzustellen, der niemals Farbstoffe enthält, die die Reaktion direkt anzeigten.

Bei den grossen Plasmodien von Aethalium septicum hat allerdings Reinke (I, 8) makroskopisch die *alkalische* Reaktion des Protoplasmas nachweisen können, und zwar schliesst er aus der Beobachtung, dass eine Bläuung von Lackmuspapier auch dann eintrat, wenn er dasselbe nicht in direkte Berührung mit den Plasmodien brachte, auf die Anwesenheit eines flüchtigen Alkalis. Uebrigens ist durch die erwähnte Beobachtung die Anwesenheit anderer alkalisch reagierender Stoffe innerhalb der Plasmodien keineswegs ausgeschlossen, und es wurde auch von Schwarz (I, 33) wahrscheinlich gemacht, dass bei den höheren Gewächsen die alkalische Reaktion des Plasmakörpers *nicht* auf der Anwesenheit von Ammoniak oder Ammoniakverbindungen beruht.

§ 426. Bei diesen hat sodann Schwarz (I, 20) die Reaktion des Plasmakörpers einerseits in der Weise festzustellen gesucht, dass er solche Zellen, die schon von Natur einen gefärbten Zellsaft enthielten, durch Alkoholzusatz, Erhitzen, Zerdrücken oder namentlich auf elektrischem Wege tödtete und die Färbung, welche das getötete Plasma annahm, beobachtete; andererseits verfuhr er auch in der Weise, dass er farblose Zellen innerhalb eines schwach angesäuerten Extraktes von Braunkohlblättern, der bei saurer Reaktion gelbrot, purpurrot bis rotviolett, neutral violett, schwach alkalisch aber blau, blaugrün, grasgrün, gelb bis gelborange gefärbt sein soll, in der gleichen Weise behandelte. Schwarz fand nun, dass der Plasmakörper nach der Tödtung auf elektrischem Wege in einzelnen Zellen blaugrün, in den meisten jedoch blau, violett oder rotviolett gefärbt war, und schliesst daraus auf die alkalische Reaktion des Plasmakörpers.

Dem gegenüber hat jedoch Arthur Meyer (III) nachgewiesen, dass der Kohlfarbstoff bei neutraler Reaktion nicht violett, sondern blau gefärbt ist, dass ferner bei Anwendung von Staniolelektroden beim Durchleiten des Stromes eine violette Zinnverbindung des Farbstoffes entsteht, die von dem getöteten Plasmakörper gespeichert wird und dass schliesslich in der Nähe der Elektroden durch Zersetzung der in dem Extrakte enthaltenen Salze verschiedenartige Verfärbungen desselben bewirkt werden

können. Es kann somit kein Zweifel darüber bestehen, dass die Schwarz'sche Methode nicht zu zuverlässigen Ergebnissen führen konnte.

§ 427. Die sichersten Aufschlüsse lassen sich auch hier jedenfalls nach der von Pfeffer angewandten Methode durch künstliche Einführung gefärbter Indikatoren in die lebenden Zellen erlangen. In der That hat auch Pfeffer (II, 259 und 266) bereits für verschiedene Zellen mit Hilfe von *Cyanin* und *Methylorange* die alkalische Reaktion des Cytoplasmas nachgewiesen.

17. Die Plasmolyse (Plasmamembranen).

§ 428. Werden lebende Pflanzenzellen in eine Salzlösung oder dergl. gebracht, so zieht sich bekanntlich der Plasmakörper bei einer gewissen Konzentration der betreffenden Lösung infolge der wasseranziehenden Kraft derselben in Gestalt eines zusammenhängenden Schlauches von der Zellmembran zurück. Dieser Vorgang, der jetzt allgemein als *Plasmolyse* bezeichnet wird, bietet zunächst das beste Mittel, um bei plasmaarmen Zellen die *Kontinuität des Plasmakörpers* zu beweisen, er spielt ausserdem aber auch namentlich bei verschiedenen morphologischen und physiologischen Untersuchungen eine wichtige Rolle.

§ 429. Bezüglich der zur Plasmolyse zu verwendenden Mittel ist vor allem erforderlich, dass dieselben auch bei der angewandten Konzentration nicht schädlich auf die betreffenden Zellen einwirken; sie dürfen also namentlich weder merklich saure, noch alkalische Reaktion besitzen. Man verwendet denn auch am besten namentlich neutrale Salze, wie z. B. *Kalisalpeter* oder *Kochsalz,* oder organische Verbindungen, wie *Rohrzucker* oder *Glycerin.* Das letztere bietet in manchen Fällen insofern einen Vorteil, als es infolge seines höheren Brechungsindex zugleich aufhellend wirkt. Bezüglich der Konzentration der anzuwendenden Lösungen lassen sich keine allgemeinen Vorschriften machen, und es ist bei der Wahl derselben namentlich der *isotonische Coëfficient* der benutzten Verbindung zu berücksichtigen. Im allgemeinen wird man übrigens mit 4 % Salpeterlösung oder 15 % Rohrzuckerlösung deutlich sichtbare Plasmolyse erhalten.

§ 430. Sind durch die Art der Untersuchung die zu plasmolisierenden Objekte nicht vorgeschrieben, so wird man natür-

lich solchen den Vorzug geben, die zur Beobachtung der Plasmolyse möglichst geeignet sind und auch eine möglichst grosse Resistenzfähigkeit gegen die etwa mit der Präparation verbundenen schädlichen Einflüsse besitzen. So stellen z. B. die Zellen der Spirogyren ein sehr geeignetes Material zur Demonstration der Plasmolyse dar. Sehr vorteilhaft sind aber ferner auch solche Zellen, die schon von Natur einen gefärbten Zellsaft enthalten, wie z. B. die Epidermiszellen von der rotgefärbten Blattunterseite von Tradescantia discolor. Bei diesen sind schon die ersten Anfänge der Plasmolyse relativ leicht zu beobachten.

§ 431. In manchen Fällen kann man die Plasmolyse auch dadurch deutlicher machen, dass man eine künstliche Färbung des Zellsaftes bewirkt. Bei den Gerbsäure-haltigen Zellen kann dies z. B. in der Weise geschehen, dass man die auf dem Objektträger in einem Tropfen der plasmolysierenden Lösung befindlichen, aber noch nicht mit einem Deckglas bedeckten Objekte nach der bereits § 308 beschriebenen Methode einige Zeit in *Osmiumsäuredämpfen* verweilen lässt. Es werden dann die Protoplasten vollständig in ihrer ursprünglichen Lage fixiert und sind infolge der Schwärzung oder Bräunung des Zellsaftes bedeutend leichter zu beobachten. Ausserdem liesse sich wohl auch in manchen Fällen durch vorausgehende Lebendfärbung die Plasmolyse deutlicher machen.

Schliesslich kann man aber auch umgekehrt durch Zusatz eines indifferenten Farbstoffes, wie z. B. *Eosin*, zu der plasmolysierenden Lösung eine Farbendifferenz zwischen dieser und dem Zellsaft bewirken.

Um auf das *Vorhandensein eines lebenden Plasmakörpers innerhalb der Gefässe* zu prüfen, injizierte Th. Lange (I, 404) grössere Pflanzenteile unter der Luftpumpe mit 5 % Salpeterlösung und setzte dann zur Fixierung verdünnte Pikrinsäurelösung zu. Nach dem Auswaschen mit Wasser und Entwässern mit Alkohol übertrug er sie dann in Nelkenöl. Aus dem so behandelten Materiale liessen sich sehr gut zarte Schnitte anfertigen, in denen dann die Plasmakörper mit Borax-Carmin oder Eosin gefärbt wurden.

Anormale Plasmolyse.

§ 432. Wie von H. de Vries (I) gezeigt wurde, bewirken manche Lösungen eine vollständige Tötung des Plasmakörpers

mit seinen Einschlüssen mit Ausnahme der inneren an den Zellsaft grenzenden Plasmahaut, die in ihrem osmotischen Verhalten nicht verändert wird, so dass sie auch dann noch den Zellsaft vollständig nach aussen abschliesst (cf. Fig. 60). Wenn nun auch dieser Vorgang, den de Vries als *anormale Plasmolyse* bezeichnet, nicht zu so weitgehenden Schlüssen berechtigt, wie sie der genannte Autor aus demselben abgeleitet hat (vergl. darüber namentlich Pfeffer VIII, 240), so kann die anormale Plasmolyse doch bei manchen Untersuchungen sehr gute Dienste leisten.

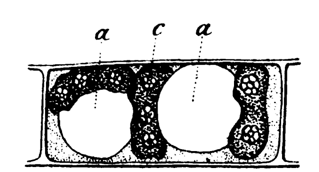


Fig. 60. Spirogyrazelle, durch eosinhaltige 10 % Kalisalpeterlösung in anormale Plasmolyse versetzt. aa Die beiden isolierten Zellsaftvakuolen, c Reste der abgestorbenen Chloroplasten.

§ 433. Zur Hervorrufung derselben benutzt man zweckmässig eine 10 % *Kalisalpeterlösung,* der man etwas *Eosin* zugesetzt hat. Dieser Farbstoff hat hier den doppelten Vorteil, dass er einerseits die getödteten Teile des Plasmakörpers sofort rot färbt und andererseits ein schärferes Hervortreten des ungefärbten Zellsaftes bewirkt. Geeignete Versuchsobjekte sind auch hier einigermassen grosse Spirogyrazellen (cf. Fig. 60).

§ 434. Zur Fixierung der isolierten Vakuolenmembranen empfiehlt Went (I, 314) ½—1 % Chromsäure, die er 1—2 Tage lang einwirken lässt; er wäscht dann die betreffenden Objekte 6 Stunden lang in fliessendem Wasser aus und überträgt sie darauf in der üblichen Weise behufs Anfertigung von Mikrotomschnitten in Paraffin.

18. Methoden zur Entscheidung der Frage, ob bestimmte Inhaltskörper der Zellen im Cytoplasma oder Zellsaft liegen.

§ 435. Die im obigen angeführte Frage ist häufig durch direkte mikroskopische Beobachtung nicht zu entscheiden, und es wurden denn auch bereits verschiedene Methoden ersonnen, die auch in schwierigeren Fällen eine sichere Entscheidung ermöglichen. So beobachtete Wakker (I) zunächst mit Hilfe des umgelegten Mikroskops, welche Bewegungen die fraglichen Körper bei Vertikalstellung des Objektträgers ausführen. Fielen dieselben dann einfach infolge ihres grösseren specifischen Gewichtes der Lotlinie folgend in den betreffenden Zellen hinab, so war es sehr

wahrscheinlich, dass die betreffenden Inhaltskörper im Zellsaft lagen. Da jedoch auch die unzweifelhaft innerhalb des Cytoplasmas liegenden stärkereichen Chromatophoren der Stärkescheide, wie von Dehnecke (I, 9) und Heine (I, 190) nachgewiesen war, relativ schnell in den betreffenden Zellen hinabsinken, schien es mir zweckmässig, diese Methode in der Weise zu modifizieren, dass ich durch Tödtung der betreffenden Zellen die leichte Verschiebbarkeit des Plasmakörpers aufhob, was z. B. durch Jodjodkaliumlösung leicht erreicht werden konnte. So wurde denn auch die Bewegung der Chromatophoren innerhalb der Stärkescheide durch Jodlösung sofort sistiert, während die unstreitig im Zellsaft liegenden Proteïnkrystalloide innerhalb der Epidermis des Blattes von Polypodium irreoides nach der gleichen Behandlungsweise auch ferner ihrer Schwerkraft entsprechende Bewegungen ausführten (cf. Zimmermann II, 68).

§ 436. Ausserdem hat Wakker (I) ferner auch die anormale Plasmolyse mit eosinhaltiger 10% Salpeterlösung (cf. § 432 und 433) zu dem gleichen Zwecke benutzt. Es war so häufig schon durch direkte Beobachtung mit voller Sicherheit zu entscheiden, ob die fraglichen Körper innerhalb der auf diese Weise isolierten Vakuolen lagen. Uebrigens konnte natürlich auch bei derartigen Präparaten aus den bei der Vertikalstellung des Objektträgers eintretenden Bewegungen eine weitere Bestätigung für die aus der direkten Beobachtung gezogenen Schlüsse abgeleitet werden.

19. Die Aggregation.

§ 437. Bei den Drüsenhaaren von Drosera rotundifolia treten infolge chemischer Reizung komplizierte Umlagerungen im Inneren der Zellen ein, die im wesentlichen darauf hinauslaufen, dass im Plasmakörper lebhafte Cirkulationsströmungen entstehen und dass die grosse centrale Vakuole in eine grosse Anzahl kleiner Vakuolen zerfällt, die sich allmählich immer mehr kontrahieren. Dieser Vorgang, der von Ch. Darwin entdeckt und namentlich von H. de Vries (II) eingehend untersucht wurde, soll im folgenden in Uebereinstimmung mit H. de Vries ausschliesslich als *Aggregation* bezeichnet werden, während Ch. Darwin und verschiedene andere Autoren auch für die gleichzeitig mit dem geschilderten Processe eintretenden künstlichen Fällungen, die sich aus-

serdem noch bei sehr zahlreichen Pflanzen finden, die gleiche Bezeichnung gebrauchen.

§ 438. Zur Beobachtung der Aggregation sind namentlich die Tentakeln von Drosera geeignet, bei denen durch den roten Zellsaft die Vakuolen besonders scharf hervortreten. Die Aggregation kann hier dadurch hervorgerufen werden, dass man ein Blatt der betreffenden Pflanze mit einem Insekt, einem Stückchen gekochten Eiweiss oder dergl. in Berührung bringt. Man kann dieselbe übrigens auch an isolierten Tentakeln beobachten, die man in eine ca. 1% Lösung von Ammonkarbonat eingetragen hat. Die Aggregation beginnt dann vom Grunde und vom Köpfchen der Tentakeln aus und ist namentlich in der Mitte derselben gut in den einzelnen Stadien zu verfolgen (cf. Fig. 61).

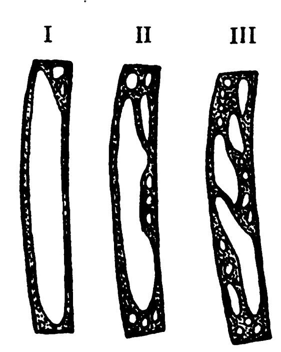


Fig. 61. Zelle aus einer Randtentakel des Blattes von Drosera rotundifolia in drei verschiedenen Stadien der Aggregation, bewirkt durch 0,1% Lösung von Ammonkarbonat. Zwischen I u. II liegen 6 Minuten, zwischen II und III 2 Minuten. Nach H. de Vries.

§ 439. Nach neueren Untersuchungen von Bokorny (IV), der auch bei verschiedenen anderen Pflanzen Aggregation beobachtete, wird dieselbe durch die verschiedenartigsten *basischen Stoffe* hervorgebracht, nur müssen dieselben, wenn sie, wie z. B. *Kalilauge* oder *Ammoniak*, hochgradig giftige Eigenschaften besitzen, in sehr starker Verdünnung angewandt werden. Eine sehr weitgehende Aggregation beobachtete der genannte Autor z. B., als er Flächenschnitte von den Blumenblättern von Tulipa suaveolens 2 bis 3 Tage in 1‰ *Coffeïnlösung* liegen liess.

§ 440. Eine etwas abweichende Erscheinung, die aber mit der Aggregation wohl sicher sehr nahe verwandt ist, beobachtete Bokorny (IV, 451), als er Schnitte von dem Narbenrande von Crocus vernus in eine 0,1% Lösung von *Coffeïn* brachte. Es zog sich dann nicht wie bei der normalen Aggregation die Vakuolenwand zusammen, sondern es kontrahierte sich der gesamte Plasmakörper, so dass zwischen diesem und der Zellmembran ein mit Wasser erfüllter Raum entstand.

20. Die künstlichen Fällungen.

§ 441. Künstliche Fällungen können durch die verschiedenartigsten Reagentien sowohl innerhalb des Cytoplasmas als auch innerhalb des Zellsaftes ohne Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der betreffenden Zellen hervorgerufen werden. Im Zellsaft können derartige Ausscheidungen häufig bereits bei der Plasmolyse entstehen. Die chemische Zusammensetzung dieser Gebilde ist jedoch zur Zeit nur für wenige Fälle mit Sicherheit ermittelt worden; immerhin kann schon jetzt als sehr wahrscheinlich gelten, dass neben *Gerbstoffen* und verwandten Substanzen namentlich *proteïnartige Verbindungen* in den künstlichen Fällungen sehr verbreitet sind.

§ 442. Fällungen, die aus relativ reiner *Gerbsäure* bestehen, werden zunächst durch *Alkalikarbonate* in den verschiedenartigsten Zellen erzeugt (cf. § 206). Dass diese meist kugelförmigen Körper keine erheblichen Mengen von Proteïnstoffen enthalten, wurde von Klercker (I) nachgewiesen.

Aehnliche Fällungen wurden auch von Bokorny (V und IV) innerhalb verschiedener Pflanzenzellen durch die verschiedenartigsten basischen Verbindungen hervorgerufen, so z. B. durch eine 0,1 % Lösung von *Coffeïn*. Dieselben sollen teils im Cytoplasma, teils im Zellsaft liegen und können, da sie auch in gerbstofffreien Zellen auftreten, jedenfalls nicht in allen Fällen aus Gerbstoffen bestehen. In wieweit aber Proteïnstoffe oder »*aktives Albumin*« (cf. § 445), das nach Bokorny den Hauptbestandteil derselben bilden soll, in denselben verbreitet sind, lässt sich nach den vorliegenden Untersuchungen nicht mit der genügenden Sicherheit entscheiden. Es ist ja auch nicht ausgeschlossen, dass wir es hier mit sehr verschiedenartigen Körpern zu thun haben.

§ 443. Bei der *Plasmolyse* eintretende Fällungen wurden von Pfeffer (II, 245) zuerst in den Wurzelhaaren von Azolla beobachtet, und zwar traten dieselben in der gleichen Weise ein, wenn auch die Plasmolyse durch Zucker, Salpeter oder Chlorcalcium bewirkt war. Diese Fällungen stimmen im wesentlichen mit den durch Ammonkarbonat bewirkten Fällungen überein und bestehen wohl meistens im wesentlichen aus Gerbstoff; ausserdem müssen aber, wie af Klercker (I, 29) gezeigt hat, jedenfalls noch andere Stoffe im Zellsaft zugegen sein, die bei der Aus-

scheidung in der Vakuolenflüssigkeit gelöst bleiben und die partielle Wiederauflösung des Gerbstoffes verhindern. Bemerkenswert ist in dieser Hinsicht auch, dass Klercker (I, 43) ähnliche Fällungen auch bei *künstlichen Zellen aus gerbsaurem Leim* beobachtet hat, wenn er dieselben mit *Salpeterlösung* plasmolysierte, während bei der Plasmolyse mit *Rohrzucker* die ganze Zelle zu einer glasigen Masse zusammenschrumpfte.

§ 444. Plasmolytische Fällungen die nicht auf der Gegenwart von Gerbstoffen beruhen, kann man z. B. sehr leicht in den Epidermiszellen der rotgefärbten Blattunterseite von Tradescantia discolor beobachten. Bringt man Tangentialschnitte derselben in ein kleines Schälchen mit 10 % Kalisalpeterlösung, so beobachtet man nach 10 Minuten, dass in allen Zellen starke Plasmolyse eingetreten ist, und in den meisten Zellen finden sich ziemlich stark lichtbrechende intensiv gefärbte Kugeln (cf. Fig. 62), während der Zellsaft zum Teil erheblich heller geworden. Wird nachträglich Wasser zugesetzt, so lösen sich diese Fällungen wieder auf. Durch Ammonkarbonat wurde in diesen Zellen keine Fällung hervorgerufen, auch trat mit Osmiumsäure keine Schwärzung derselben ein.

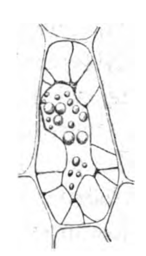


Fig. 62. Epidermiszelle von der Blattunterseite von Tradescantia discolor mit 10 % Kalisalpeterlösung plasmolysiert. Zeigt die plasmolytischen Fällungen.

21. Das Löw-Bokorny'sche Reagenz auf „aktives Albumin".

§ 445. Von Löw und Bokorny (cf. I und II) wurde in verschiedenen Schriften die Ansicht verfochten, dass das lebende und todte Protoplasma sich dadurch von einander unterscheiden, dass nur das erstere die Fähigkeit besitzen soll, aus verdünnter *alkalischer Silberlösung* Silber abzuscheiden. Die genannten Autoren schliessen hieraus weiter auf das Vorhandensein von *Aldehyd*gruppen im lebenden Eiweiss, die bei der Tödtung sofort eine Umsetzung erfahren.

§ 446. Es wurde nun allerdings schon von verschiedenen Autoren (cf. namentlich Pfeffer VII.) nachgewiesen, dass die Beobachtungen von Löw und Bokorny zum Teil unrichtig sind und dass die von ihnen als »aktives Albumin« bezeichneten Körper teilweise sicher aus Gerbstoff und dergl. bestehen. Da jedoch

das Löw-Bokorny'sche »*Lebensreagenz*« auch bereits von anderen Forschern zum Nachweis lebenden Eiweisses angewandt wurde und auch vielleicht bei kritischerer Anwendung gewisse Aufschlüsse über die Inhaltsbestandteile der Zelle zu gewähren im Stande sein dürfte, sollen im Folgenden wenigstens die von den genannten Forschern benutzten Methoden kurz zusammengestellt werden.

§ 447. Das von Löw und Bokorny als »*Lösung A*« bezeichnete Silberreagenz wird bereitet, indem man 13 ccm *Kalilösung* vom spezifischen Gewicht 1,33 (enthält 33 1/3 % KOH) und 10 ccm *Amoniakliquor* vom spezifischen Gewicht 0,96 (enthält 9 % NH_3) mischt und auf 100 ccm verdünnt. Ein ccm dieser Lösung wird vor dem Gebrauch mit 1 ccm einer 1 % *Silbernitrat*lösung versetzt und dann dies Gemisch auf 1 Liter verdünnt.

§ 448. Die *Lösung B* wird bereitet, indem man ein Liter einer Lösung von 1/1000 % *Silbernitrat* mit 5—10 ccm gesättigter *Kalk*lösung versetzt.

Beide Lösungen müssen ihrer starken Verdünnung entsprechend in sehr grossen Mengen angewandt werden, und es darf auch stets nur eine geringe Anzahl von den zu untersuchenden Objekten in dieselben gebracht werden. Die Silberausscheidung beginnt meist erst nach einigen Stunden, und es ist im Allgemeinen notwendig, die betreffenden Objekte 5—24 Stunden in den betreffenden Lösungen zu belassen.

Eine schnellere Reaktion wurde dagegen mit einer *konzentrierteren Silberlösung* erreicht, die auf 1 Liter Wasser 1 gr NO_3Ag und 0,3 gr NH_3 enthielt. Dieselbe ist aber nur bei resistenten Objekten anwendbar und bei solchen, die weder Zucker noch Gerbstoffe enthalten (cf. Bokorny VI, 195).

22. Die Plasmaverbindungen.

§ 449. Durch die neueren Untersuchungen von Tangl, Gardiner, Russow u. a. wurde bekanntlich der Nachweis geliefert, dass ausser den Elementen der Siebröhren auch in verschiedenen anderen Gewebesystemen die Protoplasten der einzelnen Zellen durch Perforationen der Zellmembranen mit einander im direkten Zusammenhange stehen. Kienitz-Gerloff (I, 22) zieht sogar neuerdings aus seinen Untersuchungen den Schluss, dass sämtliche lebende Elemente des ganzen Körpers der höheren

Pflanzen durch Plasmafäden verbunden sind. Die diese Verbindung herstellenden Plasmafäden, die sogenannten *Plasmaverbindungen,* sind aber in den meisten Fällen so fein, dass man innerhalb der lebenden Zelle von ihnen nichts beobachten kann und meist ziemlich komplizierte Präparationsmethoden zum Nachweis derselben erforderlich sind.

§ 450. Handelt es sich allerdings um relativ mächtige Plasmaverbindungen, wie z. B. bei vielen Siebröhren, so kann man dieselben in vielen Fällen einfach durch Behandlung mit Chlorzinkjod oder Jod und Schwefelsäure sichtbar machen. Von Gardiner (II, 55 Anm. 4.) wird zu diesem Zwecke auch eine Auflösung von Hofmann's *Violett* in konzentrierter Schwefelsäure empfohlen. Diese Lösung besitzt eine bräunliche Färbung und färbt die in dieselbe hineingelegten Schnitte nicht merklich. Wird die Säure aber nach kurzer — etwa ½ Minute langer — Einwirkung mit viel Wasser ausgewaschen, so nehmen die Schnitte eine zuerst grüne, dann bläuliche und schliesslich violette Färbung an, und zwar sind fast ausschliesslich die Protoplasten gefärbt. Ich erhielt in dieser Weise auch von Alkoholmaterial recht instruktive Präparate, und zwar verfuhr ich dabei in der Weise, dass ich zu den ziemlich feinen Schnitten, die äusserlich mit Fliesspapier abgetrocknet waren, auf dem Objektträger einen Tropfen der farbstoffhaltigen Schwefelsäure zusetzte und dann sofort, um allzu starke Verbiegungen der Schnitte zu vermeiden, ein Deckglas darauf brachte. Nach kurzer Zeit wurde dann der ganze Objektträger in eine grosse Schale mit Wasser getaucht, in der derselbe verblieb, bis die Schnitte rein violett geworden waren; löste sich das Deckglas hierbei auch meistens von dem Objektträger los, so blieben doch meist einige Schnitte auf diesem haften, die dann natürlich am zweckmässigsten zur Untersuchung benutzt wurden.

§ 451. Eine sehr intensive Färbung der in den Siebporen enthaltenen Plasmaverbindungen erhielt ich bei Mikrotomschnitten von Cucurbitaceenstengeln auch durch Anwendung der Altmann'schen *Säurefuchsin* Tinktion (cf. § 345.). Dieselbe lies die Plasmastränge auch ohne vorherige Anwendung von Quellungsmitteln äusserst deutlich hervortreten.

In manchen Fällen giebt schliesslich auch die § 290 beschriebene Doppelfärbung mit *Anilinblau* und *Eosin* sehr intensive Präparate von den Siebplatten mit den dieselben durchsetzenden Plasmaverbindungen.

§ 452. *Zartere Plasmaverbindungen* konnten dagegen bisher nur durch eine successive Wirkung von Quellungs- und Färbungsmitteln sichtbar gemacht werden. Zur *Quellung* wurde bisher namentlich Chlorzinkjod und Schwefelsäure verwandt.

Chlorzinkjod wurde namentlich von Gardiner (II) empfohlen. Dieser Autor behandelt die von frischem Materiale stammenden Schnitte zunächst mit einer *Jodjodkaliumlösung,* setzt dann *Chlorzinkjod* zu und lässt dasselbe je nach der Quellungsfähigkeit der betreffenden Membranen längere oder kürzere Zeit einwirken, gewöhnlich ca. 12 Stunden. Vor dem Färben wird das Chlorzinkjod mit Wasser oder bei stark gequollenen Membranen mit Alkohol ausgewaschen.

§ 453. Auch bei Anwendung von *Schwefelsäure* wurden die Schnitte meist zuvor mit einer *Jodjodkalilösung* fixiert. Kienitz-Gerloff (I, 8) verwandte zu diesem Zwecke eine Lösung, die 5 cg Jod und 20 cg Jodkalium in 15 g Wasser aufgelöst enthielt. Namentlich bei saftigen Geweben empfiehlt dieser Autor aber auch nach der von A. Fischer (III) bei den Untersuchungen über den Inhalt der Siebröhren mit bestem Erfolg angewandten Methode (cf. § 454) grosse Pflanzen oder wenigstens grössere Pflanzenteile möglichst schnell in kochendem Wasser abzubrühen und vor dem Schneiden mit absolutem Alkohol nachzuhärten.

Bezüglich der Konzentration der zur Quellung benutzten Schwefelsäure sei erwähnt, dass dieselbe teils in konzentrierter Form, teils nach der Verdünnung mit 1/4 Wasser angewandt wurde. Bei stark quellungsfähigen Membranen ist natürlich der verdünnten Säure der Vorzug zu geben. Die Zeit der Einwirkung richtet sich hauptsächlich nach der Beschaffenheit der betreffenden Zellmembranen. Bei der konzentrierten Säure genügen aber meist wenige Sekunden. Vor dem Färben muss die Säure natürlich durch sorgfältiges Auswaschen mit Wasser entfernt werden.

§ 453. Zur *Färbung* der in dieser Weise behandelten Schnitte wurden namentlich folgende Farbstoffe verwandt.

1. Hofmann's *Blau* (identisch mit *Anilinblau*). Gardiner (II) empfiehlt namentlich eine Lösung dieses Farbstoffes in mit *Pikrinsäure* gesättigtem 50% *Alkohol.* Dieselbe wird mit Wasser ausgewaschen und das Präparat dann entweder in Glycerin eingeschlossen, oder es wird dasselbe nach dem Auswaschen in Wasser in verdünnten und nach diesem allmählich in konzentrierten Alkohol übertragen, mit Nelkenöl aufgehellt und in Canadabalsam

eingeschlossen. In dieser Weise erhält man sehr gut haltbare Dauerpräparate von den Plasmaverbindungen.

Ausserdem verwandte Gardiner auch eine Lösung von Hofmann's Blau in 50% Alkohol, der mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert war. Die weitere Behandlung ist die gleiche wie in dem vorhergehenden Falle.

Terletzki (I, 455) färbt dagegen einfach mit einer starken wässerigen Lösung von Anilinblau und beobachtet nach vorherigem Auswaschen direkt in Wasser.

2. Hofmann's *Violett* wird von Gardiner einfach in wässeriger Lösung angewandt. Dasselbe färbt zunächst Membran und Plasmakörper ziemlich gleich intensiv; nach längerem Liegen in Glycerin, das in manchen Fällen mehrere Tage dauern kann, werden aber die Membranen ausgewaschen, während die Protoplasten nebst den Plasmaverbindungen stark gefärbt bleiben.

3. *Methylviolett* wird von Kienitz-Gerloff (I, 9) für solche Zellen empfohlen, die, wie Haare und dergl., infolge von Cuticularisierung der Membran dem Hofmannsblau den Durchtritt nicht gestatten. Er verwendet dasselbe in konzentrierter wässeriger Lösung.

Erwähnen will ich schliesslich noch, dass es nach Gardiner zweckmässig sein soll, die Schnitte nach der Quellung und Färbung mit einem Pinsel von Kameelshaaren abzubürsten.

§ 454. Eine von den bisherigen wesentlich abweichende Methode zur Sichtbarmachung der Plasmaverbindungen wurde neuerdings von Kohl (I, 12) angewandt. Dieselbe stimmt im wesentlichen mit der Löffler'schen Cilienfärbungsmethode (cf. § 476) überein. Kohl färbte nach vorhergegangener *Tanninbeizung* mit *Methylenblau* oder *Bismarckbraun* und behandelte, wenn die auf der Anwesenheit von Pectinstoffen beruhende Mitfärbung der Zellmembranen oder Gallertscheiden die Beobachtung beeinträchtigte, zur Entfernung dieser Stoffe zuerst mit einer Säure. Genauere Angaben über seine Methode hat der genannte Autor nicht gemacht.

23. Inhalt der Siebröhren.

§ 455. Da der Inhalt der unter einander mit relativ grossen Oeffnungen kommunizierenden Siebröhren beim Anschneiden der Pflanzenteile zum Teil aus denselben herausgepresst wird und die

verschiedenartigsten Veränderungen erfährt, wurde von A. Fischer (III) eine Methode ersonnen, welche den Siebröhreninhalt innerhalb der unverletzten Pflanzenteile zu fixieren gestattet. Fischer taucht zu diesem Zwecke ganz vorsichtig ausgetopfte Pflanzen oder Teile eines unversehrten Gewächses, etwa Zweigspitzen, in *siedendes Wasser* und belässt sie in diesem so lange, bis der gesamte Siebröhreninhalt zum Gerinnen gebracht ist, wozu im allgemeinen 2—5 Minuten völlig ausreichen. Er konnte mit Hilfe dieser Methode den Nachweis liefern, dass die bei Anwendung der gewöhnlichen Präparationsweise bei Cucurbita und zahlreichen anderen Gewächsen beobachteten Ansammlungen stark lichtbrechender und tinktionsfähiger Substanz an der einen Seite der Sieb-

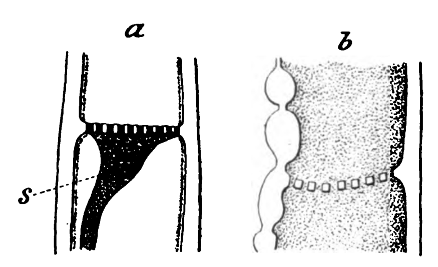


Fig. 63. Siebröhrenstücke von Cucurbita Pepo. a. Von einer zerschnittenen und dann abgebrühten Pflanze, s Schlauchkopf; b. im unverletzten Zustande abgebrüht (675). Nach Fischer.

platten, die sogenannten »*Schlauchköpfe*« (s Fig. 63, a), Kunstprodukte darstellen und erst beim Anschneiden des Siebröhrensystems entstehen. Sie fehlten einerseits bei dem in der obigen Weise abgebrühten Material gänzlich (cf. Fig. 63, b), und wurden auf der anderen Seite bei Pflanzenteilen, wo sie infolge von Verletzungen entstanden waren, durch nachheriges Eintragen in kochendes Wasser nicht verändert.

§ 456. Nach den an diesem abgebrühten Material angestellten Untersuchungen von A. Fischer (VI) haben wir ferner je nach der Gliederung des Siebröhreninhaltes 3 verschiedene Arten von Siebröhren zu unterscheiden.

1. *Siebröhren mit gerinnbarem Saft*, (bei den Cucurbitaceen). Bei diesen besteht der Inhalt aus einem schmächtigen protoplasmatischen Wandbeleg und einem klaren, in der Hitze gerinnenden Safte.

2. *Siebröhren mit Schleim* (z. B. bei Humulus). Der Inhalt

besteht aus einem zarten, mit kleineren und grösseren Schleimmengen beladenen Wandbelege und einer klaren nicht gerinnenden wässrigen Flüssigkeit.

3. *Siebröhren mit Stärkekörnern* (z. B. bei Coleus). Der Inhalt besteht aus einem zarten, geringe Schleimmengen führenden Wandbelege und einer klaren, nicht gerinnenden Flüssigkeit mit kleinen Stärkekörnern.

Anhang.

Die Untersuchungsmethoden der Bakterien.

§ 457. Da die in der Bakteriologie üblichen Methoden in mancher Beziehung von denen abweichen, die bei der Untersuchung der übrigen pflanzlichen Organismen benutzt werden, habe ich es vorgezogen, die ersteren in einem besonderen Abschnitte zusammenzustellen. Im Nachfolgenden beabsichtige ich nun übrigens keineswegs eine auch nur einigermassen erschöpfende Zusammenfassung der bakteriologischen Methodik zu geben. Ich habe es mir vielmehr nur zur Aufgabe gemacht, eine Anzahl zuverlässiger Präparationsmethoden zusammenzustellen, die bei der Untersuchung der Bakterien wohl in den meisten Fällen völlig ausreichen dürften. Diejenigen, die sich spezieller mit der Bakteriologie befassen wollen, muss ich dagegen auf die einschlägigen Spezialwerke, namentlich die von Günther (I) und Hüppe (I) verweisen.

I. Die Beobachtung lebender Bakterien.

§ 458. Die Beobachtung lebender Bakterien geschieht im allgemeinen nach den für die anderen niederen Organismen üblichen Methoden. Will man dieselbe auf einen längeren Zeitraum ausdehnen, so bringt man die Bakterien am zweckmässigsten in den hängenden Tropfen (cf. § 2). Ausserdem ist unter Umständen auch eine häufige Erneuerung der Kulturflüssigkeit notwendig.

Handelt es sich um *sehr lebhaft bewegliche Bakterien,* so kann man dieselben durch geeignete Fixierungsmittel z. B. Jod- oder Osmiumsäuredämpfe zur Ruhe bringen.

Erwähnen will ich schliesslich noch, dass man unter Umständen auch die *Dunkelfeldbeleuchtung* des Abbé'schen Beleuchtungsapparates bei der Beobachtung der Bakterien mit Erfolg anwenden kann.

II. Die Fixierungsmethoden.

1. Deckglaspräparate.

a. Fixierung durch trockene Hitze.

§ 459. Zur Fixierung der aus bakterienhaltigen Flüssigkeiten, Gelatinekulturen oder dergl. stammenden Bakterien benutzt man zur Zeit fast ausschliesslich trockene Hitze, und zwar führt man diese Fixierung gewöhnlich nach der von R. Koch herrührenden Methode in folgender Weise aus:

Man bringt zunächst mit Hilfe eines durch Glühen sterilisierten Platindrahtes einen kleinen Tropfen der bakterienhaltigen Flüssigkeit auf ein sauber gereinigtes Deckglas [1]) und breitet ihn möglichst gleichmässig auf demselben aus. Hat man die Bakterien einem festen Nährboden zu entnehmen, so bringt man auf das Deckglas zunächst einen Tropfen Wasser und zerreibt in diesem möglichst vollständig mit Hilfe eines Platindrahtes ein sehr kleines Partikelchen des zu untersuchenden Materiales.

Von den in der beschriebenen Weise mit Bakterien bestrichenen Deckgläsern lässt man nun zunächst bei gewöhnlicher Temperatur die Flüssigkeit verdunsten, bis das Präparat »*lufttrocken*« geworden ist.

Hierauf werden die Bakterien in der Weise fixiert, dass man das betreffende Deckglas mit der Bakterienseite nach oben drei mal durch die nicht leuchtende Flamme des Bunsenbrenners zieht [2]). Für die Geschwindigkeit, mit der dies zu geschehen hat, kann die von Johne gegebene Vorschrift als Anhaltspunkt dienen, nach der die Hand bei gleichmässiger Bewegung einen horizontalen Kreis beschreiben soll, der einen Fuss im Durchmesser hat und den die Hand jedesmal in einer Sekunde zurücklegt.

§ 460. Die Bakterien werden hierdurch derartig auf dem Deckgläschen festgeklebt, dass man sie mit beliebigen Farblösungen

---

1) Das Reinigen der Deckgläser kann zweckmässig nach der von Günther (I, 40 Anm.) vorgeschlagenen Methode geschehen, nach der man die mit Alkohol gereinigten Gläschen in der nicht leuchtenden Flamme des Bunsen'schen Brenners erhitzt.

2) Sehr zweckmässig sind bei diesen und den im folgenden beschriebenen Manipulationen die sogenannten Kühne'schen *Pinzetten* zu verwenden, deren Arme ca. 1½ cm von der Spitze entfernt umgebogen sind und mit breiter Fläche endigen.

etc. behandeln kann, ohne dass eine Loslösung zu befürchten wäre. Es ist sogar möglich, Präparate, die schon seit längerer Zeit in Canadabalsam eingeschlossen waren, nachträglich noch von neuem zu färben oder umzufärben. Man braucht zu diesem Zwecke nur zur Verflüssigung des Canadabalsams das Präparat gelinde zu erwärmen, von dem sodann abgehobenen Deckglas mit Xylol den Balsam herunterzulösen und schliesslich das Xylol mit Alkohol abzuwaschen.

Schliesslich sei noch erwähnt, dass die in der oben beschriebenen Weise fixierten Bakterien in diesem Zustande ohne Schaden beliebig lange aufbewahrt werden können, wenn man sie nur vor Staub und Feuchtigkeit schützt, indem man sie z. B. in Filtrierpapier einwickelt.

§ 461. Um von Präparaten aus Blut oder dergl. die stark tinktionsfähigen roten Blutkörperchen ihrer tinktionsfähigen Substanz zu berauben, empfiehlt Günther (I, 63) die in der oben beschriebenen Weise fixierten Objekte mit 1—5 % *Essigsäure* abzuspülen; es wird so das tinktionsfähige Haemoglobin aus den Blutkörperchen extrahiert und ein grosser Teil des Plasmas von den Präparaten heruntergewaschen, während die Bakterien unverändert bleiben. Präparate, die in Folge längerer Aufbewahrung im trockenen Zustande nach obiger Methode keine befriedigenden Resultate geben, behandelt Günther mit bestem Erfolg mit 2—3 % *Pepsinlösung*.

b. Andere Fixierungsmethoden.

§ 462. Da bei der im vorigen Abschnitte beschriebenen Fixierungsmethode gewisse Ungleichmässigkeiten kaum zu vermeiden sind, wurde von H. Möller (II, 274) vorgeschlagen, die lufttrockenen Präparate an Stelle des Erwärmens durch absoluten *Alkohol* zu fixieren, und zwar belässt er dieselben 2 Minuten lang innerhalb dieser Flüssigkeit.

§ 463. Von A. Fischer (II) wurde ferner die beachtenswerte Thatsache nachgewiesen, dass namentlich bei dem Eintrocknenlassen häufig Kunstprodukte entstehen, die in erster Linie Folge der *Plasmolyse* (cf. § 428) der Bakterienzellen sind. Wie Fischer gezeigt, werden nämlich die Bakterien schon durch Lösungen von relativ geringer Konzentration plasmolysiert; so genügt im allgemeinen schon eine 1 % Kochsalzlösung, um bei den meisten Bakterien Plasmolyse hervorzurufen. Fischer (II, 73)

empfiehlt mit Rücksicht hierauf eine 10% *Milchsäurelösung* zur Fixierung der Bakterien zu verwenden, die eine spätere Tinktion mit alkoholischen Anilinfarbstofflösungen nicht verhindern soll.

§ 464. Ausserdem dürften nun aber auch wohl sicher die für die höheren Pflanzen üblichen Fixierungsmethoden bei der Untersuchung der feineren Struktur der Bakterienzellen mit gewissem Erfolg zu benutzen sein. Die Anwendung derselben würde wohl im allgemeinen zweckmässig nach der Overton'schen Methode geschehen können. Beachtenswert ist jedoch in dieser Hinsicht, dass die Membranen der Bakterien durch eine relativ grosse Impermeabilität ausgezeichnet sind. Von A. Fischer (II, 72) wurde nämlich gezeigt, dass speziell 1% Osmiumsäure und 1% Sublimatlösung eine nur unvollständige Fixierung der Bakterienzellen bewirken.

2. Schnittpräparate.

§ 465. Zur Fixierung der Bakterien innerhalb der infizierten Organismen verwendet man gewöhnlich absoluten Alkohol, in den man Stücke von dem betreffenden Objekte direkt einträgt. Zum Schneiden derselben benutzt man zweckmässig das Mikrotom, nachdem man in Paraffin (cf. § 43) oder Celloidin eingebettet hat.

III. Tinktionsmethoden.

§ 466. Im folgenden soll zunächst eine Anzahl von Methoden zusammengestellt werden, die man in den meisten Fällen mit bestem Erfolg anwenden kann, wenn es sich einfach um den Nachweis des Vorhandenseins von bestimmten Bakterien innerhalb einer Flüssigkeit, eines krankhaften Organismus oder dergl. handelt. Eine besondere Besprechung sollen dann noch die Färbungsmethoden für die Tuberkelbacillen, die Bakterien-Sporen und die Geisseln derselben finden.

1. Die Färbung mit Löffler's Methylenblau.

§ 467. Das Löffler'sche Methylenblau besteht aus 30 ccm konzentrierter alkoholischer Methylenblaulösung und 100 ccm wässeriger 0,01% Kalilösung. Es besitzt unbegrenzte Haltbarkeit.

Bei *Deckglaspräparaten* wendet man dasselbe zweckmässig in

der Weise an, dass man das Präparat mit einigen Tropfen Farblösung vorsichtig bis zu merklicher Dampfbildung erwärmt, dann den Farbstoff mit Wasser abspült und an der Luft (ohne Erwärmung!) austrocknen lässt. Dann bringt man einen Tropfen Canadabalsam auf einen Objektträger und setzt auf diesen das Deckgläschen. Diese Methode giebt zwar keine sehr intensive Färbung, lässt aber häufig zarte Differenzierungen scharf hervortreten.

Zur Färbung von *Schnittpräparaten* lässt man, falls dieselben unter der Erwärmung leiden würden, das Methylenblau längere Zeit einwirken. Man wäscht dasselbe dann ebenfalls mit Wasser aus und überträgt in Canadabalsam, indem man die Schnitte entweder zuvor eintrocknen lässt (cf. § 23) oder Anilin zwischen Wasser und Xylol einschaltet (cf. § 24). Manche Bakterien, wie z. B. die Milzbrandbazillen, vertragen übrigens auch sehr gut die Behandlung mit Alkohol und können mithin in der gewöhnlichen Weise in Canada-Balsam übertragen werden.

2. Ziel'sches Carbolfuchsin.

§ 468. Die Ziel'sche Lösung von Carbolfuchsin wird dargestellt durch Verreiben von 1 gr Fuchsin mit 100 ccm 5% wässeriger Carbolsäurelösung unter allmählichem Zusatz von 10 ccm Alkohol. Sie ist dauernd haltbar.

Bei *Deckglaspräparaten* braucht man dieselbe nur kurze Zeit (etwa 1 Minute) einwirken zu lassen. Unter Umständen kann man auch noch durch Erwärmen die Wirkung beschleunigen. Zum Auswaschen kann man Wasser benutzen und dann nach vorherigem Austrocknen in Canadabalsam einschliessen. Stark gefärbte Objekte vertragen aber auch ein längeres Auswaschen mit Alkohol und können dann nach Uebertragung in Xylol in Canadabalsam eingeschlossen werden.

Für *Schnittpräparate* scheint das Carbolfuchsin weniger geeignet.

3. Ehrlich'sche Anilinwasser-Lösungen.

§ 469. Diese Lösungen werden bereitet, indem man 100 ccm Anilinwasser mit 11 ccm einer konzentrierten alkoholischen Lösung von *Fuchsin, Gentianaviolett* oder *Methylviolett* versetzt. In diesem Gemisch entstehen zunächst Trübungen, die eine sofortige Anwendung der Lösung verhindern. Nach 24 Stunden kann man

dieselbe aber nach vorheriger Filtrierung zur Färbung benutzen. Sie bleibt übrigens nur wenige Wochen verwendbar.

Bei *Deckglaspräparaten* genügt es diese Lösungen 1 Minute unter Erwärmung auf dieselben einwirken zu lassen. Man wäscht dann den Farbstoff mit Wasser ab, lässt eintrocknen und schliesst in Canadabalsam ein.

Von Schnittpräparaten erhält man bessere Färbungen der Bakterien unter Anwendung der in den nächsten Paragraphen besprochenen Gram'schen Methode.

4. Die Gram'sche Methode.

§ 470. Die sogenannte Gram'sche Methode ist namentlich für Schnitte sehr geeignet, weil sie in diesen die Bakterien intensiv färbt, ohne gleichzeitig eine Färbung der Kerne zu bewirken. Uebrigens ist dieselbe auch bei Deckglaspräparaten anwendbar, namentlich wenn dieselben ausser den Bakterien zahlreiche andere tinktionsfähige Körper enthalten.

Nach der ursprünglichen Vorschrift von Gram wird nun diese Methode in der Weise ausgeführt, dass man die Schnitte zunächst für mehrere Minuten in Ehrlich'sche Anilinwasser-Gentianaviolett-Lösung (cf. § 469) bringt und dann in eine Jodjodkalium-Lösung, die auf 300 Teile Wasser 1 Teil Jod und 2 Teile Jodkalium enthält, überträgt; nach einigen weiteren Minuten wird sodann mit Alkohol ausgewaschen, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird, dann in Nelkenöl, das den Farbstoff noch weiter auszieht, übertragen und schliesslich in Canadabalsam eingeschlossen.

§ 471. Nach Günther (I, 89) ist es jedoch in den meisten Fällen zweckmässiger, die Schnitte nach der Behandlung mit der Jodjodkaliumlösung $1/2$ Minute mit Alkohol, dann *genau* 10 Sekunden [1]) mit 3% Salzsäure-Alkohol und darauf sofort bis zur vollständigen Entfärbung mit reinem Alkohol zu behandeln. Zur Uebertragung aus diesem in Canadabalsam empfiehlt der genannte Autor Xylol an Stelle des Nelkenöls anzuwenden.

Nach der von Weigert angegebenen Methode werden die Schnitte nach der Behandlung mit Jodkalium mit Anilin betropft, das differenzierend und entwässernd wirkt, und dann in Xylol und Canadabalsam übertragen.

---

1) Für einigermassen dünne Paraffinschnitte ist diese Zeitdauer übrigens jedenfalls zu lang bemessen.

§ 472. Eine scharfe *Doppelfärbung*, bei der die Kerne abweichend von den Bakterien gefärbt sind, erhält man übrigens durch vorherige Färbung mit Pikrokarmin (cf. § 318). Diese Lösung lässt man 1—2 Minuten auf die Schnitte einwirken, wäscht dann sorgfältig mit Wasser aus, bringt in Alkohol und färbt sodann ganz nach der Gram'-, oder nach der Gram-Günther'-schen Methode weiter.

5. Die Färbung der Tuberkelbacillen.

§ 473. Die Tuberkel- und die Leprabacillen sind durch ein eigenartiges Verhalten gegen Tinktionsmittel ausgezeichnet, das eine isolierte Färbung derselben in Bakteriengemischen und somit eine sichere Unterscheidung derselben von anderen Bakterienarten möglich macht. Von den zahlreichen zur Färbung der Tuberkelbacillen empfohlenen Methoden sei an dieser Stelle nur die folgende von Czaplewski (I) herrührende erwähnt, mit der ich ausgezeichnete Resultate erhielt.

Deckglaspräparate werden nach der Fixierung zunächst eine Minute lang unter Erwärmung zum Sieden mit Carbolfuchsin (cf. § 468) behandelt; dann werden sie mit der sogenannten Ebner'schen Flüssigkeit [1]) ausgewaschen, bis kaum noch eine Spur von Färbung sichtbar ist, dann wird nochmals mit reinem Alkohol nachgespült und mit einem Gemisch von 3 Teilen Wasser und 1 Teil konzentrierter alkoholischer Methylenblaulösung nachgefärbt; dieses wird sodann mit Wasser abgespült, darauf wird das Präparat getrocknet und in der gewöhnlichen Weise in Canadabalsam eingeschlossen.

Behandelt man in dieser Weise z. B. ein Gemisch von Tuberkelbacillen mit anderen Bakterien, das man sich ja auch leicht durch Vermischen von Reinkulturen künstlich herstellen kann, so wird man finden, dass, wenn wir von den sehr seltenen Leprabacillen absehen, allein die Tuberkelbacillen rot gefärbt sind, während alle anderen Bakterien eine blaue Farbe zeigen.

§ 474. Die Färbung der Tuberkelbacillen in Schnitten kann im Wesentlichen nach den gleichen Methoden ausgeführt werden. Handelt es sich um Paraffinschnitte, die mit Eiweiss aufgeklebt sind (cf. § 52), so kann man dieselben ebenfalls in der Carbol-

1) Dieselbe besteht aus 20 Teilen Wasser, 100 Teilen Alkohol, 0,5 Teilen Salzsäure und 0,5 Teilen Chlornatrium.

fuchsinlösung erhitzen, und es genügt eine Einwirkung derselben von wenigen Minuten. Vertragen die Schnitte dagegen das Erhitzen nicht, so muss man die Fuchsinlösung längere Zeit (etwa 24 Stunden) einwirken lassen. Sodann ist es bei Schnitten zweckmässiger das Methylenblau mit Alkohol auszuwaschen und vermittelst Xylol in Canada-Balsam zu übertragen.

An derartig behandelten Präparaten sind nur die etwa vorhandenen Tuberkelbacillen intensiv rot, die anderen Bakterien und Gewebskerne blau gefärbt.

6. Die Färbung der Bakterien-Sporen.

§ 475. Nach der von H. Möller (II) vorgeschlagenen Methode erreicht man eine gut differenzierte Färbung der Bakteriensporen dadurch, dass man die durch Erhitzen oder durch Alkohol fixierten Deckglaspräparate für 5 Sekunden bis 10 Minuten in 5 % Chromsäure [1]) taucht, dann mit Wasser gründlich abspült, mit Carbolfuchsin betröpfelt und unter einmaligem Aufkochen 60 Sekunden in der Flamme erwärmt; das Carbolfuchsin wird dann abgegossen, das Deckgläschen bis zur Entfärbung in 5 % Schwefelsäure getaucht und abermals gründlich mit Wasser ausgewaschen. Dann lässt man 30 Sekunden lang wässerige Lösung von Methylenblau oder Malachitgrün einwirken, spült dies mit Wasser ab, lässt austrocknen und schliesst in Canadabalsam ein. Bei gut gelungenen Präparaten sind dann die Sporen mit leuchtend roter Farbe innerhalb des blauen oder grünen Bakterienkörpers sichtbar.

An Stelle der Chromsäure kann übrigens auch Chlorzink oder Chlorzinkjod als Beize benutzt werden, doch erfordern diese gewöhnlich eine längere Einwirkung.

Die Färbung der Cilien der Bakterien.

§ 476. Zur Färbung der Cilien der Bakterien wurden namentlich von Trenkmann (I) und Löffler (I) verschiedene

1) Im allgemeinen ist eine ca. 30 Sekunden lange Einwirkung der Chromsäure erforderlich; doch zeigen in dieser Beziehung die einzelnen Bakterienarten grosse Verschiedenheiten; so ist nach Möller die günstigste Dauer der Einwirkung: für den braunen Kartoffelbacillus 30 Sekunden, für den gelben 2 Minuten, für den weissen 10 Minuten, für den Bacillus cyanogenus 30 Sekunden, für den Milzbrandbacillus 2 Minuten, für den Tetanusbacillus 2 Minuten. Von Bacillus subtilis erhielt ich sehr schöne Sporenfärbung, als ich die Chromsäure 30 Sekunden auf die durch Erhitzen fixierten Deckglaspräparate einwirken liess.



Methoden vorgeschlagen. Nach der neusten Veröffentlichung von Löffler ist zu diesem Zwecke die folgende Methode am meisten geeignet: Die Bakterien werden zunächst auf das sehr sorgfältig gereinigte Deckglas (cf. § 459 Anm.) aufgestrichen und in der gewöhnlichen Weise durch dreimaliges durch die Flamme Ziehen fixiert, wobei eine zu starke Erhitzung auf das sorgfältigste zu vermeiden ist. Auf das erwärmte Deckgläschen wird nunmehr die Beize aufgetragen, die am zweckmässigsten durch Mischen von 10 ccm 20% wässeriger Tanninlösung, 5 ccm kalt gesättigter Eisenvitriollösung und 1 ccm wässeriger Fuchsinlösung bereitet wird. Je nach der Beschaffenheit der Bakterien müssen übrigens diesem Gemisch noch einige Tropfen Schwefelsäure oder Natronlauge hinzugefügt werden [1]). Mit demselben wird nun das Deckglas über einer Flamme erwärmt, bis Dampfbildung eintritt und nach $^1/_2$—1 Minute die Beize mit destiliertem Wasser abgespült und dann das Deckglas in der gewöhnlichen Weise getrocknet. Sodann wird die Farbflüssigkeit aufgetropft in einer solchen Menge, dass das Deckglas ganz davon bedeckt ist, wiederum eine Minute bis zur Dampfbildung erwärmt und endlich mit dem Wasserstrahle abgespült, getrocknet und in der üblichen Weise in Canadabalsam eingeschlossen. Als Färbflüssigkeit empfiehlt Löffler eine Lösung von Fuchsin in Aninlinwasser oder auch ein Gemisch von 100 ccm Anilinwasser, 1 ccm 1% Natronlösung und festem Fuchsin im Ueberschuss.

---

1) So sollen zur Färbung der Geisseln der Typhusbacillen zu 16 ccm der obigen Beize 22 Tropfen 1% wässeriger Lösung von Natronhydrat zugesetzt werden, für Bacillus subtilis 28—30 Tropfen. Umgekehrt verlangen die Cholerabacillen, den Zusatz von $^1/_2$—1 Tropfen einer Schwefelsäure, die gerade ein gleiches Volum 1% Natronlauge neutralisiert, Bacillus pyocyaneus einen Zusatz von 5—6 Tropfen obiger Säure, Spirillum rubrum einen solchen von 9 Tropfen. Dahingegen besitzt die obengenannte Beize die gerade richtige Reaktion für das Spirillum concentricum. Auch bei Spirillum Undula ist dieselbe ohne weiteren Zusatz nach Versuchen des Verf. sehr geeignet.

Litteraturverzeichnis.

Allen, Edwin West, I. Untersuchungen über Holzgummi, Xylose und Xylonsäuren. Inaug.-Diss. Göttingen 1890.

Altmann, I. Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Leipzig. 1890.

— II. Ueber Nucleïnsäuren. Archiv f. Anatomie u. Physiologie Physiol. Abt. 1889. p. 524.

— III. Die Struktur des Zellkernes. Ib. Anatom. Abt. 1889. p. 409.

Ambronn, H., I. Ueber das optische Verhalten der Cuticula und der verkorkten Membranen. Ber. d. D. bot. Ges. 1888. p. 226.

Arnaud, A., I. Recherches sur la composition de la carotine, sa fonction chimique et sa formule. Comptes rendus. 1886. T. 102. p. 1119.

— II. Recherches sur les matières colorantes des feuilles; identité de la matière rouge orangé avec la carotine, $C_{18}H_{24}O$. Ib. 1885. T. 100. p. 751.

— A. u. Padé, L., I. Recherche chimique de l'acide nitrique, des nitrates dans les tissus végétaux. Comptes rendus. T. 98. p. 1488.

Askenasy, E., I. Beiträge zur Kenntnis des Chlorophylls und einiger dasselbe begleitenden Farbstoffe. Bot. Zeitg. 1867. p. 225.

Bachmann, E, I. Emodin in Nephoroma lusitanica Ber. d. D. bot. Ges. 1887. p. 192.

— II. Spektroskopische Untersuchungen über Pilzfarbstoffe. Progr. d. Gymnasiums zu Plauen. Ostern 1886

— III. Mikrochemische Reaktionen auf Flechtenstoffe als Hilfsmittel zum Bestimmen der Flechten. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. III. p. 216.

— IV. Ueber nicht krystallisierte Flechtenfarbstoffe. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. XXI. p. 1.

— V. Mikrochemische Reaktionen auf Flechtenfarbstoffe. Flora 1887. p. 291.

— VI. Referat über Solla (II). Zeitschrift f. w. Mikrosk. Bd. 2. p. 260.

de Bary, I. Ueber die Wachsüberzüge der Epidermis. Bot. Zeitg. 1871. p. 129 und 566.

— II. Morphologie u. Biologie der Pilze. II. Aufl. Leipzig 1884.

Behrens, J., Ueber einige ätherisches Oel secernierende Hautdrüsen. Ber. d. D. bot. Ges. 1886. p. 400.

— W., I. Leitfaden der botanischen Mikroskopie. Braunschweig 1890.

— II. Tabellen zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. Ib. 1887.

— III. Hilfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen. Ib. 1883.

Beilstein, I—III. Handbuch der organischen Chemie. II. Auflage. Leipzig. 1886—1890. Bd. I—III.

Belzung, I. Recherches morphol. et physiolog. sur l'amidon et les grains de chlorophylle. Ann. d. sc. nat. Bot. Sér. VII. T. 5. p. 179.

Berthold, I. Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig 1886.

— II. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Meeresalgen. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. XIII. p. 569.

Bokorny, Th., I. Eine bemerkenswerte Wirkung oxydierter Eisenvitriollösungen auf lebende Pflanzenzellen. Ber. d. D. bot. Ges. 1889. p. 274.

— II. Ueber den Nachweis von Wasserstoffsuperoxyd in lebenden Pflanzenzellen. Ib. p. 275.

— III. Das Wasserstoffsuperoxyd und die Silberabscheidung durch aktives Albumin. Pringheim's Jahrb. Bd. 17. p. 347.

— IV. Ueber Aggregation. Ib. Bd. 20. p. 427.

— V. Ueber die Einwirkung basischer Stoffe auf das lebende Protoplasma. Ib. Bd. 19. p. 206.

— VI. Neue Untersuchungen über den Vorgang der Silberabscheidung durch aktives Albumin. Ib. Bd. 18. p. 194.

Borodin, I. Ueber die mikrochemische Nachweisung und die Verbreitung des Dulcits im Pflanzenreich. Revue d. sc. n. p. p. l. Soc. d. Nat. d. St. Petersb. 1890. N. 1. p. 26. (Ref.: Bot. Centralbl. 1890. Bd. 43. p. 175).

— II. Ueber die physiologische Rolle und die Verbreitung des Asparagins im Pflanzenreiche. Bot. Zeitung. 1878. p. 801.

— III. Ueber einige bei Bearbeitung von Pflanzenschnitten mit Alkohol entstehende Niederschläge. Ib. 1882. p. 589.

— IV. Ueber Sphaerokrystalle aus Paspalum elegans und über die mikrochemische Nachweisung von Leucin. Arbeiten d. St. Petersb. Naturf. Ges. Bd. XIII. p. 47. (Ref.: Bot. Centralbl. 1884. Bd. XVII. p. 102).

Borscow, El., I. Beiträge zur Histochemie der Pflanzen. Bot. Zeitg. 1874. p. 17.

Braemer, L., Un nouveau réactiv histo-chimique des tannins. Bull. Soc. d'Hist. Nat. de Toulouse. Janv. 1889. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikroskopie. Bd. VI. p. 114).

Bredow, Hans, I. Beiträge zur Kenntnis der Chromatophoren. Pringsheim's Jahrb. f. w. Bot. Bd. 22. p. 349.

Büsgen, I. Art und Bedeutung des Tierfanges bei Utricularia vulgaris. Ber. d. D. bot. Ges. 1888. p. LV.

Bütschli, O., I. Ueber den Bau der Bakterien und verwandter Organismen. Leipzig. 1890.

Campbell, Douglas H., I. The Staining of living Nuclei. Untersuch. a. d. botan. Institut zu Tübingen. Bd. II. p. 569.

Clautrian, G., I. Recherches microchimiques sur la localisation des alcaloides dans le Papaver somniferum. Ann. de la Soc. Belge de Microsc. T. XII. 1889. p. 67. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VI. p. 243).

Cohn, Ferdinand, I. Untersuchungen über Bakterien II. Cohn's Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. Bd. I Heft III. p. 141.

Correns, Carl Erich, I. Ueber Dickenwachstum durch Intussusception bei einigen Algenmembranen. Münchener Inaug.-Diss. 1889. u. Flora 1889.

— II. Zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der extranuptialen Nectarien von

Dioscorea. Sitzungsber. d. k. Akad. d. W. in Wien. Mathem.-naturw. Cl. Bd. XCVII. Abt. I. 1888. p. 652.

Correns, Carl Erich, III. Zur Kenntnis der inneren Struktur der vegetabilischen Zellmembranen. Pringsheim's Jahrb. f. w. Botan. Bd. XXIII. p. 254.

Courchet, I. Recherches sur les chromoleucites. Annales d. sc. nat. Bot. Sér. VII. T. VII. 1888. p. 263.

Czaplewski, Eugen, I. Die Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. Jena 1891.

Dehnecke, I. Ueber nicht assimilierende Chlorophyllkörper. Inaug.-Dissert. Bonn 1880.

Detmer, W., I. Das pflanzenphysiologische Praktikum. Jena. 1888.

Dippel, I. Kalium-Quecksilberjodid als Quellungsmittel. Zeitschrift f. w. Mikroskopie. Bd. I. p. 251.

— II. Handbuch der allgemeinen Mikroskopie. II. Aufl. Braunschweig. 1882.

Dogiel, A. S., I. Ein Beitrag zur Farbenfixierung von mit Methylenblau tingierten Präparaten. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VIII. p. 15.

Dragendorff, Georg, I. Die qual. und quant. Analyse von Pflanzen und Pflanzenteilen. Göttingen. 1882.

Dufour, Jean, I. Notices microchimiques sur le tissu épidermique des végétaux. Bull. de la Soc. vaud. d. Sc. nat. V. XXII. Nr. 94.

— Recherches sur l'amidon soluble. Ib. V. XXI. Nr. 93.

Engelmann, Th. W., I. Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen. Bot. Zeitung. 1881. p. 441.

Errera, Léo, I. Ueber den Nachweis des Glycogens bei Pilzen. Bot. Zeitung. 1886. p. 316.

— II. Sur le glycogène chez les Basidiomycètes. Mém. de l'Acad. d. Belgique. T. 37. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. III. p. 277).

— III. Sur l'emploi de l'encre de Chine en microscopie. Bull. d. l. Soc. belge de Microscopie. T. X. p. 478. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. II. p. 84).

— IV. Canarine. Ib. p. 183. (Ref.: Botan. Jahresber. 1884. p. 193).

— V. Sur la distinction microchimique des alcaloides et des matières protéiques. Annales de la Soc. belge de microscopie. Mémoires. Tome. XIII. (Ref.: Bot. Centralbl. 1891. Bd. 46. p. 225).

— Maistriau et Clautriau, I. Premières recherches sur la localisation et la signification des alcaloides dans les plantes. Ann. de la Soc. Belge de Microscopie. T. XII. 1889. p. 1. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VI. p. 389).

Eternod, A., I. Instruments destinés à la microscopie. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. IV. p. 39.

Fischer, Alfred, I. Ueber das Vorkommen von Gypskrystallen bei den Desmidiaceen. Pringsheim's Jahrb. Bd. XIV. p. 133.

— II. Die Plasmolyse der Bakterien. Berichte der K. Sächs. Ges. d. W. Math. phys. Cl. 1891. p. 52.

— III. Ueber den Inhalt der Siebröhren in der unverletzten Pflanze. Ber. d. D. bot. Ges. 1885. p. 230.

— IV. Neue Beobachtungen über Stärke in den Gefässen. Ib. 1886. p. XCVII.

— V. Beiträge zur Physiologie der Holzgewächse. Pringsheim's Jahrb. Band XXII. p. 73.

Fischer, Alfred, VI. Neue Beiträge zur Kenntnis der Siebröhren. Ber. d. math.-phys. Klasse der K. Sächs. Ges. d. Wiss. 1886.

— Emil, I. Synthesen in der Zuckergruppe. Bericht d. D. chem. Ges. 1890. Bd. 23. p. 2114.

Flemming, W., I. Ueber Teilung und Kernformen bei Leukocyten und über deren Attraktionssphären. Archiv. f. mikr. Anatom. Bd. 37. p. 249.

— II. Weiteres über die Entfärbung osmierten Fettes in Terpentin und anderen Substanzen. Zeitschrift f. w. Mikrosk. Bd. VI. p. 178.

— III. Neue Beiträge zur Kenntnis der Zelle. II. Teil. Archiv f. mikr. Anatomie. Bd. 37. p. 685.

Forssell, K. B. J., I. Beiträge zur Mikrochemie der Flechten. Sitzungsber. d. K. Acad. der W. z. Wien. Mathem.-naturw. Kl. 1886. Bd. 93. Abt. I. p. 219.

Frank, B., I. Untersuchungen über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff. Landwirtsch. Jahrb. 1888. p. 421.

— Bemerkungen zu vorstehendem Artikel (Kreusler I). Ib. p. 723.

Gardiner, Walter, I. On the Phenomena accompanying Stimulation of the Gland-Cells in the Tentacles of Drosera dichotoma. Proccedings of the R. Soc. of London. V. XXXIX. p. 229.

— II. On the continuity of the protoplasm through the walls of vegetable cells. Arb. d. bot. Instit. in Würzb. Bd. III. p. 52.

— III. The determination of Tannin in vegetable cells. The Pharm. Journ. and Transact. 1884. N. 709. p. 588. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikroskop. Bd. I, p. 464).

Gibelli, Giuseppe, I. Nuovi studi sulla malattia del Castagno detta dell' inchiostro. Bologna. 1883. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. I. p. 137).

Gierke, Hans, I. Färberei zu mikroskopischen Zwecken. Braunschweig. 1885.

Gilson, Eugène, I. La subérine et les cellules du liège. La cellule etc. p. p. Carnoy. T. VI. 1890. p. 63.

Giltay, E., I. Ueber das Verhalten von Haematoxylin gegen Pflanzenzellmembranen. Sitzungsbericht der K. Akadem. d. Wiss. zu Amsterdam. 27. Oktober 1883. p. 2.

Gravis, A., I. L'Agar-Agar comme fixatif des coupes microtomiques. Bull. d. l. Soc. belge de microscopie. 1889. p. 72. (Ref.: Bot. Centralblatt. 1890. Bd. 41. p. 13).

Green, J. R., On the germination of the tuber of the Jerusalem Artischoke. Annals of Botany. 1889. Vol. I. p. 223. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. 1889. Bd. 6. p. 244).

Günther, Carl, I. Einführung in das Studium der Bakteriologie, Leipzig. 1891.

Guignard, Léon, I. Développement et constitution des anthérozoïdes. Revue gén. de Botanique. Bd I. p. 11.

— II. Sur la localisation des principes qui fournissent les essences sulfurées des Crucifères. Comptes rend. 1890. T. 111. p. 249.

— III. Sur la localisation, dans les plantes, des principes qui fournissent l'acide cyanhydrique. Ib. 1890. T. 110. p. 477.

— IV. Nouvelles études sur la fécondation. Annales d. sc. nat. Bot. Sér. VII. T. XIV. p. 163.

Haberlandt, G. I. Das reizleitende Gewebesystem der Sinnpflanze. Leipzig 1890.

Hanausek, T. F., I. Zur histochemischen Coffeïnreaktion. Zeitschr. d. Allg. Oesterreich. Apotheker-Vereins. 1891. p. 606. (Ref.: Bot. Centralbl. 1891. Bd. 48. p. 284).

Hansen, A., I. Ueber Sphaerokrystalle. Arb. d. botan. Instituts in Würzburg. Bd. III. p. 92.

— II. Das Chlorophyllgrün der Fucaceen. Ib. p. 288.

— III. Die Farbstoffe der Blüten und Früchte. Verh. d. Physik.-Med. Gesellschaft zu Würzburg. N. F. Bd. XVIII. N. 7.

Hanstein, J. v., I. Ueber eine Conferve, welche die Eigentümlichkeit hat, sich mit Gürteln von Eisenoxydhydrat zu umkleiden. Sitzungsber. d. niederrh. Ges. zu Bonn. 1878. p. 73.

Harz, C. O., I. Ueber Physomyces heterosporus n. sp. Botan. Centralblatt 1890. Bd. 41. p. 405.

— Ueber die Entstehung und Eigenschaften des Spergulins, eines neuen Fluorescenten. Botan. Zeitg. 1877. p. 489.

Haug, R., I. Winke zur Darstellung von Präparaten von intra vitam mit Anilinfarben injizierten Geschwulstpartien. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VIII. p. 11.

Hauptfleisch, Paul, I. Zellmembran und Hüllgallerte der Desmidiaceen. Inaug.-Dissert. Greifswald. 1888.

Haushofer, H., I. Mikroskopische Reaktionen. Braunschweig 1885.

Hegler, Robert, I. Histochemische Untersuchungen verholzter Zellmembranen. Flora 1890. p. 31.

Heine, H, I. Ueber die physiologische Funktion der Stärkescheide. Ber. d. D. bot. Ges. 1885. p. 189.

Heinricher, E., I. Verwendbarkeit der Eau de Javelle zum Nachweis kleiner Stärkemengen. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. III. p. 213.

Henking, Ein einfaches Mikrotommesser. Zeitschr. f. w. Mikroskopie. 1885. Bd. II. p. 509.

Hermann, F., I. Beiträge zur Histologie des Hodens. Archiv f. mikrosk. Anatomie. Bd. 34. p. 58.

— II. Beiträge zur Lehre von der Entstehung der karyokinetischen Spindel. Ib. Bd. 37. p. 569.

Herrmann, Ottomar, I. Nachweis einiger organischer Verbindungen in den vegetabilischen Geweben. Inaug.-Diss. Leipzig. 1876.

Hieronymus, G., I. Ueber Dicranochaete reniformis Hieron., eine neue Protococcacea des Süsswassers. Cohn's Beiträge z. Biolog. der Pflanzen. Bd. V. p. 351.

v. Höhnel, I. Ueber den Kork und verkorkte Gewebe überhaupt. Sitzungsber. d. Acad. der Wiss. zu Wien. Bd. 76. I. p. 507.

— II. Histochemische Untersuchungen über das Xylophilin und das Coniferin. Ib. Band 67. I. p. 663.

Hoffmeister, W., I. Die Rohfaser und einige Formen der Cellulose. Landwirtschaftl. Jahrbücher. 1888. p. 239.

— II. Die Cellulose und ihre Formen. Ib. 1889. p. 767.

Holzner, Georg, I. Ueber Krystalle in den Pflanzenzellen. Inaug.-Dissert. und Flora. 1864.

Hueppe, Ferdinand, I. Die Methoden der Bakterien-Forschung. V. Auflage. Wiesbaden. 1891.

Husemann, A., und A. Hilger und Th. Husemann, I. Die Pflanzenstoffe. II. Aufl. 1882—84.

Ihl, Anton, I. Einwirkung der Phenole auf Cinnamaldehyd. Zimmtaldehyd, ein wahrscheinlicher Bestandteil der Holzsubstanz. Chemikerzeitung 1889. p. 560. (Ref.: Bot. Centralblatt. 1889. Bd. 39. p. 184).

— II. Ueber neue empfindliche Holzstoff- und Cellulose-Reagentien. Ib. 1885. p. 266. (Ref.: Zeitschr. für w. Mikrosk. Bd. II. p. 259).

Immendorff, H., I. Das Carotin im Pflanzenkörper und Einiges über den grünen Farbstoff des Chlorophyllkorns. Landwirtschaftl. Jahrbücher. 1889. p. 507.

Jönsson, B., I. Entstehung schwefelhaltiger Oelkörper in den Mycelfäden von Penicillium glaucum. Botan. Centralbl. 1889. Bd. 37. p. 201.

Kärner, W., I. Ueber den Abbruch und Abfall pflanzlicher Behaarung und den Nachweis von Kieselsäure in Pflanzenhaaren. Nova Acta d. Ksl. Leop.-Carol. D. Acad. d. Naturf. 1889. Bd. 54. N. 3. p. 219.

Kienitz-Gerloff, I. Die Protoplasmaverbindungen zwischen benachbarten Gewebselementen in der Pflanze. Botan. Zeitg. 1891. p. 1.

Kirchner, I. Die mikroskopische Pflanzenwelt des Süsswassers. Braunschweig 1885.

Klebahn, I. Studien über Zygoten I. Pringheim's Jahrb. Bd. 22. p. 415.

Klebs, I. Ueber die Organisation einiger Flagellatengruppen. Untersuch. a. d. bot. Institut zu Tübingen. Bd. I. p. 233.

— Ueber die Organisation der Gallerte bei einigen Algen und Flagellaten. Ib. Bd. II. p. 333.

— III. Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle. Ib. p. 489.

— IV. Einige Bemerkungen zu der Arbeit von Krasser »Untersuchungen über das Vorkommen von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut etc.« Botan. Zeitg. 1887. p. 697.

— V. Ein kleiner Beitrag zur Kenntnis der Peridineen. Ib. 1884. p. 721.

Klein, J., I. Die Krystalloide der Meeresalgen. Pringsheim's Jahrb. Bd. XIII. p. 23.

Klercker, John af, I. Studien über die Gerbstoffvakuolen. Tübinger Inaugur.-Dissert. 1888.

— II. Ueber das Kultivieren lebender Organismen unter dem Mikroskop. Zeitschrift f. w. Mikrosk. Bd. VI. p. 145.

Kohl, F. G., I. Protoplasmaverbindungen bei Algen. Bericht d. D. botan. Ges. 1891. p. 9.

— II. Anatomisch - physiologische Untersuchung der Kalksalze und Kieselsäure in der Pflanze. Marburg. 1889.

Krabbe, G., I. Untersuchungen über das Diastaseferment unter spezieller Berücksichtigung seiner Wirkung auf Stärkekörner innerhalb der Pflanze. Pringsheim's Jahrb. f. w. Bot. Bd. 21. p. 520.

Krasser, Fridolin, I. Untersuchungen über das Vorkommen von Eiweiss in der pflanzlichen Zellhaut, nebst Bemerkungen über den mikrochemischen Nachweis der Eiweisskörper. Sitzungsbericht der K. Akad. der Wiss. zu Wien. 1886. Bd. 94. Abt. I. p. 118.

Kreusler, I. Zum Nachweis von Nitraten im Erdboden etc. Landwirtsch. Jahrbücher. 1888. p. 721.

Kügler, Karl, I. Ueber das Suberin. Strassburger Inaug.-Dissert. 1884.

Lagerheim, G. I. Ueber die Anwendung von Milchsäure bei der Untersuchung trockener Algen. Hedwigia. 1888. p. 58. (Ref.: Ztschr. f. w. Mikr. Bd. V. p. 552).

Lagerheim, G. II. L'acide lactique, excellent agent pour l'étude des champignons secs. Revue mycologuique. T. XI. 1889. p. 95. (Ref.: Ib. Bd. VI. p. 380).

Lange, Gerhard, I. Zur Kenntnis des Lignins. I. Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. XIV. p. 15.

— II. Id. II. Mitteilung. Ib. p. 217.

— Theodor I. Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung der Gefässe und Tracheïden. Flora. 1891. p. 393.

Lecomte, Henri, I. Contribution à l'étude du liber des Angiospermes. Ann. des sc. nat. Bot. Sér. 7. T. 10. p. 193.

Leitgeb, H., I. Ueber die durch Alkohol in Dahliaknollen hervorgerufenen Ausscheidungen. Botan. Zeitung. 1887. p. 129.

— II. Der Gehalt der Dahliaknollen an Asparagin und Tyrosin. Mitteilungen a. d. Botan. Instit. zu Graz. Heft II. p. 215.

Lindt, O., I. Ueber den Nachweis von Phloroglucin. Zeitschr. f. w. Mikroskop. Bd. 2. p. 495.

— II. Ueber den mikrochemischen Nachweis von Brucin und Strychnin. Ib. Bd. I. p. 237.

Löffler, I. Weitere Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln bei den Bakterien. Centralbl. für Bakteriol. u. Parasit. 1890. Bd. VII. p. 625.

Loew, O., I. Noch einmal über das Protoplasma. Botan. Zeitg. 1884. p. 113.

— II. Ueber den mikrochemischen Nachweis von Eiweisstoffen. Ib. p. 273.

— und Bokorny, I. Ueber das Verhalten der Pflanzenzellen zu stark verdünnter alkalischer Silberlösung. II. Botan. Centralblatt 1889. Bd. 39. p. 369.

— II. Die chemische Kraftquelle im lebenden Protoplasma. München. 1882.

Lüdtke, Franz, I. Beiträge zur Kenntnis der Aleuronkörner. Pringsheim's Jahrb. Bd. 21. p. 62.

Mattirolo, O., I. Skatol e Carbazol, due nuovi reagenti per le membrane lignificate. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. II. p. 354.

Mangin, Louis, I. Observations sur la membrane du grain de pollen mur. Bull. d. l. Soc. bot. de France. T. 36. 1889. p. 274.

— II. Sur la callose, nouvelle substance fondamentale existant dans la membrane. Comptes rendus. T. CX. 1890. p. 644.

— III. Sur la structure des Péronosporées. Ib. T. III. 1890. p. 923.

— IV. Sur la présence des composés pectiques dans les végétaux. Ib. T. 109. 1889, II. p. 579.

— V. Sur les réactifs colorants des substances fondamentales de la membrane. Ib. 1890, II. T. III. p. 120. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikroskopie. Bd. VII. p. 409).

— VI. Sur la substance intercellulaire. Ib. T. 110. p. 295. (Ref.: Ib. p. 545).

— VII. Sur les réactifs jodés de la cellulose. Bull. d. l. Soc. bot. d. France. T. 35. 1888. p. 421. (Ref.: Ib. Bd. VI. p. 242).

Lundström, Axel N., I. Ueber farblose Oelplastiden und die biologische Bedeutung der Oeltropfen gewisser Potamogeton-Arten. Botan. Centralblatt, Bd. 35. p. 177.

Mayer, P. I. Aus der Mikrotechnik. Internat. Monatschr. f. Anatom. n. Physiol. Bd. IV. 1887. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. IV. p. 76).

— II. Einfache Methode zum Aufkleben mikroskopischer Schnitte. Mitt. a. d. Zool. Stat. Neapel. Bd. IV. 1883. p. 521. (Ref.: Ib. Bd. II. p. 225).

Melnikoff, I. Untersuchungen über das Vorkommen des kohlensauren Kalkes in Pflanzen. Inaug.-Diss. Bonn 1877.

Meyer, Arthur, I. Ueber Stärkekörner, welche sich mit Jod rot färben. Berichte d. D. bot. Ges. 1886. p. 337.

— II. Das Chlorophyllkorn. Leipzig. A. Felix. 1883. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. I. p. 302).

— III. Kritik der Ansichten von Frank Schwarz über die alkalische Reaktion des Protoplasmas. Bot. Zeitg. 1890. p. 234.

— IV. Mikrochemische Reaktion zum Nachweis der reduzierenden Zuckerarten. Ber. d. D. botan. Ges. 1885. p. 332.

Migula, I. Beiträge zur Kenntnis des Gonium pectorale. Botan. Centralbl. 1890. Bd. 44. p. 72.

Miliarakis, I. Die Verkieselung lebender Elementarorgane bei den Pflanzen. Würzburg 1884. Inaug.-Diss.

Möller, Hermann, I. Anatomische Untersuchungen über das Vorkommen der Gerbsäure. Ber. d. D. bot. Ges. 1888. p. LXVI.

— II. Ueber eine neue Methode der Sporenfärbung. Centralblatt f. Bakteriologie und Parasitenkunde. 1891. Bd. X. p. 273.

Molisch, I. Grundriss einer Histochemie der pflanzlichen Genussmittel. Jena 1891.

— II. Ueber merkwürdig geformte Proteïnkörper in den Zweigen von Epiphyllum. Ber. d. D. botan. Gesellsch. 1885. p. 195.

— III. Ein neues Coniferinreagenz. Ib. 1886. p. 301.

— IV. Zur Kenntnis der Thyllen, nebst Beobachtungen über Wundheilung in der Pflanze. Sitzungsber. d. K. Akad. d. W. in Wien. Math. nat. Cl. Bd. 97. Abt. I. p. 264.

— V. Zwei neue Zuckerreaktionen. Ib. 1886. Bd. 93. Abt. II. p. 912.

— VI. Ueber den mikrochemischen Nachweis von Nitraten und Nitriten in der Pflanze mittelst Diphenylamin oder Brucin. Bericht der D. botan. Gesellsch. 1883. p. 150.

Moll, J. W., I. Eene nieuwe mikrochemische looizuurreactie. Maandblad voor Natuurwetenschappen. 1884. (Ref.: Bot. Centralbl. 1885. Bd. 24. p. 250).

Monteverde, I. Ueber die Ablagerung von Calcium- und Magnesium-Oxalat in der Pflanze. Petersburg 1889. (Ref.: Bot. Centralbl. 1890. Bd. 43. p. 327).

— II. Ueber Krystallablagerungen bei den Marattiaceen. Arb. d. St. Petersb. Naturf. Ges. 1886. Bd. 17. p. 33. (Ref.: Ib. Bd. 39. p. 358).

Müller, Carl Oscar, I. Ein Beitrag zur Kenntnis der Eiweissbildung in der Pflanze. Leipziger Inaug.-Diss. 1886. (Sep.-Abdr. aus Landw. Versuchsstat).

— N. J. C., I. Spectralanalyse der Blütenfarben. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. XX. p. 78.

Nadelmann, Hugo, I. Ueber die Schleimendosperme der Leguminosen. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. 21. p. 609.

Nägeli, C. und S. Schwendener, I. Das Mikroskop. II. Aufl. 1877.

— W. I. Beiträge zur näheren Kenntnis der Stärkegruppe. Münchener Inaug.-Dissert. Leipzig. 1874.

Nebelung, Hans, I. Spektroskopische Untersuchungen der Farbstoffe einiger Süsswasseralgen. Bot. Zeitg. 1878. p. 369.

Nickel, Emil, I. Die Farbenreaktionen der Kohlenstoffverbindungen. II. Aufl. Berlin 1890.

Nickel, Emil, II. Bemerkungen über die Farbenreaktionen und die Aldehydnatur des Holzes. Botan. Centralblatt. 1889. Bd. 38. p. 753.

Niggl, I. Das Indol ein Reagenz auf verholzte Membranen. Flora 1881. p. 545.

Nobbe, Hänlein und Councler, I. Vorl. Notiz betr. d. Vorkommen von phosphorsaurem Kalk in der lebenden Pflanzenzelle. Landw. Versuchsstat. 1879. Bd. 23. p. 471.

Noll, Fritz, I. Experimentelle Untersuchungen über das Wachstum der Zellmembranen. Würzburger Habilitationsschrift u. Abhandl. der Senckenberg. naturf. Gesellsch. Bd. XV. 1887. p. 101.

Obersteiner, H., I. Ein Schnittsucher. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. III. p. 55.

Overton, I. Mikrotechnische Mitteilungen. Zeitschrift f. w. Mikroskopie. 1890. Bd. VII. p. 9.

— II. Beiträge zur Histologie und Physiologie der Characeen. Botan. Centralbl. 1890. Bd. 44. p. 1.

Palla, I. Ed., Beobachtungen über Zellhautbildung an des Zellkernes beraubten Protoplasten. Flora. 1890. p. 314.

Pfeffer, I. Untersuchungen über die Proteïnkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen. Pringsheim's Jahrb. Bd. VIII. p. 429.

— II. Ueber Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Untersuchungen a. d. botan. Instit. zu Tübingen. Bd. II. p. 179.

— III. Hesperidin, ein Bestandteil einiger Hesperideen. Botan. Zeitung 1874. p. 529.

— IV. Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen. Abhandlungen der mathem.-phys. Cl. d. K. Sächs. Gesellsch. d. W. Bd. XV. p. 375.

— V. Osmotische Untersuchungen. Leipzig 1877.

— VI. Die Oelkörper der Lebermoose. Flora. 1874. p. 2.

— VII. Löw und Bokorny's Silberreduktion in Pflanzenzellen. Ib. 1889. p. 46.

— VIII. Zur Kenntnis der Plasmahaut und der Vakuolen. Abhandl. d. math.-phys. Cl. der Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss. Bd. XVI. p. 187.

Pfeiffer, Ferdinand, R. v. Wellheim, I. Mitteilungen über die Anwendbarkeit des venetianischen Terpentins bei botanischen Dauerpräparaten. Zeitschrift f. w. Mikrosk. Bd. 8. p. 29.

Pfitzer, E., I. Ueber ein Härtung und Färbung vereinigendes Verfahren für die Untersuchung des plasmatischen Zellleibes. Berichte d. D. botan. Gesellsch. 1883. p. 44.

Plugge, I. Salpetrige Säure haltiges Quecksilbernitrat als Reagenz auf aromatische Körper mit einer Gruppe OH am Benzolkern. Archiv der Pharmacie. 1890. Bd. 228. p. 9.

Poulsen, I. Botanische Mikrochemie. Uebersetzt von C. Müller. Cassel 1881.

— II. Note sur la préparation des grains d'aleurone. Revue gén. d. Botan. 1890. p. 547.

Praël, Edmund, I. Vergleichende Untersuchungen über Schutz- und Kern-Holz der Bäume. Pringsheim's Jahrb. Bd. XIX. p. 1.

Pringsheim, I. Ueber Cellulinkörner. Ber. d. D. botan. Ges. 1883. p. 288.

— II. Ueber Lichtwirkung und Chlorophyllfunktion. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. 12. p. 288.

Rabl, I. Ueber Zellteilung. Morphologisches Jahrbuch. Bd. X. 1885. p. 214.

Radlkofer, L., I. Zur Klärung von Theophrasta und der Theophrasteen. Sitzungsbericht der math.-physik. Kl. d. k. b. Akad. d. Wiss. zu München. 1889. Bd. 19. p. 221.

— II. Ueber die Gliederung der Familie der Sapindaceen. Ib. 1890. Bd. 20. p. 105.

Ranvier, I. Technisches Lehrbuch der Histologie. Uebersetzt v. Nicati und von Wyss. Leipzig. 1888.

Reichl, C. und C. Mikosch, I. Ueber Eiweissreaktionen und deren mikrochemische Anwendung. Jahresbericht der K. K. Oberrealschule in d. II. Bezirke von Wien. Wien. 1890.

Reinitzer, Friedrich, I. Bemerkungen zur Physiologie des Gerbstoffs. Ber. d. D. botan. Ges. 1889. p. 187.

— II. Ueber die wahre Natur des Gummifermentes. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. 14. p. 453.

Reinke, Friedrich, I. Untersuchungen über das Verhältnis der von Arnold beschriebenen Kernformen zur Mitose u. Amitose. Inaug.-Diss. Kiel. 1891.

— J., I. Die chemische Zusammensetzung des Protoplasma von Aethalium septicum. Untersuch. a. d. botan. Labor. d. Univ. Göttingen. Heft II. p. 1.

— II. Beitrag zur Kenntnis des Phycoxanthins. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. X. p. 399.

Reiss, I. Ueber die Natur der Reservecellulose und über ihre Auflösungsweise bei der Keimung der Samen. Landwirtschaftliche Jahrbücher. Bd. XVIII. 1889. p. 711.

Rhumbler, L., I. Die verschiedenen Cystenbildungen und die Entwicklungsgeschichte der holotrichen Infusoriengattung Colpoda. Zeitschr. f. wiss. Zoologie. Bd. 46. 1888. p 549. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VI. p. 50).

Richter, K., I. Beiträge zur genaueren Kenntnis der chemischen Beschaffenheit der Zellmembran bei den Pilzen. Sitzungsber. d. Akadem. d. Wiss. zu Wien. Bd. 83. I. p. 494.

Rosoll, Alexander, I. Ueber den mikrochemischen Nachweis der Glykoside und Alkaloide in den vegetabilischen Geweben. 25. Jahresber. des Landes-Realgymnasiums zu Stockerau. 1889—90.

— II. Beiträge zur Histochemie der Pflanzen. Sitzungsbericht d. Acad. d. Wiss. zu Wien. 1884. Bd. 89. Abt. I. Mathem.-naturw. Kl.

Rostafinski, J., Ueber den roten Farbstoff einiger Chlorophyceen, sein sonstiges Vorkommen und seine Verwandtschaft zum Chlorophyll. Botan. Zeitung. 1881. p. 461.

Russow, I. Ueber die Verbreitung der Callusplatten bei den Gefässpflanzen. Sitzungsbericht d. naturf. Gesellsch. d. Univ. Dorpat. Bd. 6. p. 63.

Sachs, Julius v., I. Ueber die Stoffe, welche das Material zum Wachstum der Zellhäute liefern. Pringsheim's Jahrb. Bd. III. p. 183.

Sanio, Carl, I. Ueber die in der Rinde dicot. Holzgewächse vorkommenden krystallinischen Niederschläge und deren anatomische Verbreitung. Monatsber. d. Berl. Akad. 1857. p. 252.

— II. Einige Bemerkungen über den Bau des Holzes. Botan. Zeitung. 1860. p. 193.

Schenck, H., I. Ueber Konservierung von Kernteilungsfiguren. Inaug.-Diss. Bonn. 1890. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VII. p. 38).

Schimper, I. Ueber die Krystallisation der eiweissartigen Substanzen. Zeitschrift f. Krystallogr. u. Mineral. Bd. V. 1881. p. 131.

Schimper, II. Zur Frage der Assimilation der Mineralsalze durch die grüne Pflanze. Flora. 1890. p. 207—261.
— III. Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. Pringsheim's Jahrb. Bd. 16. p. 1.
Schönfeld, Selmar, I. Modification of Pagan's growing slide. Journ. R. Microsc. Soc. 1888. pt. 6. p. 1028. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikroskopie. Bd. VI. p. 51).
Schmitz, I. Die Chromatophoren der Algen. Bonn 1882.
— II. Beiträge zur Kenntnis der Chromatophoren. Pringsheim's Jahrbücher f. w. Bot. Bd. XV. p. 1.
Schütt, Franz, I. Ueber Peridineenfarbstoffe. Ber. d. D. bot. Ges. 1890. p. 9.
— II. Ueber das Phycoërythrin. Ib. 1888. p. 36.
— III. Ueber das Phycophaein. Ib. 1887. p. 259.
— IV. Weitere Beiträge zur Kenntnis des Phycoërythrins. Ib. 1888. p. 305.
Schulze, E., I. Ueber die stickstofffreien Reservestoffe einiger Leguminosensamen. Ber. d. D. botan. Ges. 1889. p. 355.
— E., E. Steiger und W. Maxwell, I. Zur Chemie der Pflanzenzellmembranen. I. Abhandlung. Zeitschrift f. physiologische Chemie. Bd. 14. 1890. p. 227.
— Franz Eilhard, I. Ein Entwässerungsapparat. Archiv f. mikrosk. Anatomie. Bd. 26. p. 539.
Schwarz, Frank, I. Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Breslau 1887. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. V. H. 1.
— II. Chemisch-botanische Studien über die in den Flechten vorkommenden Flechtensäuren. Ib. Bd. III. p. 249.
Shimoyama, I. Beiträge zur Kenntnis des japanischen Klebreisses. Inaug.-Diss. Strassburg. 1886.
Singer, I. Beiträge zur näheren Kenntnis der Holzsubstanz und der verholzten Gewebe. Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. W. Bd. 85. Abt. I. p. 345.
Solereder, H., I. Studien über die Tribus der Gaertnereen Benth.-Hook. Ber. d. D. bot. Gesellsch. 1890. p. (71).
Solla, R. F., I. Zur näheren Kenntnis der chemischen und physikalischen Beschaffenheit der Intercellularsubstanz. Oesterr. bot. Zeitschr. 1879. November. (Ref.: Bot. Jahresber. 1880. p. 8).
— II. Ueber zwei wahrscheinliche mikrochemische Reaktionen auf Schwefelcyanallyl. Botan. Centralbl. 1884. Bd. XX. p. 342.
Steinach, Eugen, I. Siebdosen, eine Vorrichtung zur Behandlung mikroskopischer Präparate. Zeitschrift f. w. Mikrosk. Bd. IV. p. 433.
Strasburger, I. Das botanische Praktikum. II. Auflage. 1887.
Streng, A., I. Ueber eine neue mikroskopisch-chemische Reaktion auf Natrium. 24. Ber. d. Oberh. Gesellsch. f. Nat. u. Heilk. Giessen 1885. p. 56. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. III. p. 129).
— II. Ueber einige mikroskopisch-chemische Reaktionen. Ib. p. 54. (Ref.: Ib. Bd. II. p. 429).
— III. Ueber einige mikroskopisch-chemische Reaktionen. Neues Jahrbuch für Mineralogie 1888. Bd. II. p. 142. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikroskopie. Bd. V. p. 554).

Suchannek, I. Technische Notiz betreffend die Verwendung des Anilinöls in der Mikroskopie sowie einige Bemerkungen zur Paraffineinbettung. Zeitschrift f. w. Mikrosk. Bd. VII. p. 156.

Temme, I. Ueber Schutz- und Kernholz, seine Bildung und physiologische Bedeutung. Landwirtsch. Jahrb. 1883. p. 173.

Terletzki, P., I Anatomie der Vegetationsorgane von Struthiopteris germanica Willd und Pteris aquilina L. Pringsheim's Jahrb. Bd. 15. p. 452.

Thörner, W., I. Ueber den im Agaricus atrotomentosus vorkommenden chinonartigen Körper. Bericht d. D. chemisch. Gesellsch. 1878. p. 533 und 1879 p. 1630.

van Tieghem, I. Sur les globules amylacés des Floridées. Comptes rendus. T. LXI. 1865. p. 804.

— et Douliot, I. Recherches comparatives sur l'origine des membres endogènes. Ann. des sc. nat. Botan. Sér. VII. T. 8.

Trenkmann, I. Die Färbung der Geisseln von Spirillen und Bacillen. Centralblatt f. Bacteriol. und Parasitenk. 1889. Bd. VI. p 433.

Treub, I. Quelques Recherches sur le rôle du noyau dans la division des cellules végétales. Naturk. Verh. d. K Akad. Vol. XIX. Amsterdam 1878.

Vinassa, E., I—III. Beiträge zur pharmakognostischen Mikroskopie. Zeitschrift f. w. Mikroskopie. Bd. II. p. 309, Bd. IV, p. 295 u. Bd. VIII. p. 34.

Virchow, H., Ueber die Einwirkung des Lichtes auf Gemische von chromsauren Salzen (resp. Chromsäure), Alkohol und extrahierten organischen Substanzen. Archiv f. mikrosk. Anatomie. 1885. Bd. XXIV. p. 117. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. II. p. 272).

Voigt, A., I. Lokalisierung des ätherischen Oeles in den Geweben der Allium-Arten. Jahrbuch der Hamburgischen wissenschaftlichen Anstalten VI. 1889. (Ref.: Bot. Centralbl. 1890. Bd. 41. p. 292).

Vosseler, I. Einige Winke für die Herstellung von Dauerpräparaten. Zeitschr. f. w. Mikrosk. 1890. Bd. VII. p. 457.

— Venetianisches Terpentin als Einschlussmittel für Dauerpräparate. Ib. Bd. VI. p. 292.

de Vries, I. Plasmolytische Studien über die Wand der Vakuolen. Pringsheim's Jahrb. Bd. 16. p. 465.

— II. Ueber die Aggregation im Protoplasma von Drosera rotundifolia. Botan. Zeitung 1886. p. 1.

Waage, Th, I. Ueber das Vorkommen und die Rolle des Phloroglucins in der Pflanze. Ber. d. D. botan. Ges. 1890. p. 250.

Wakker, J. H., I. Studien über die Inhaltskörper der Pflanzenzellen. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. 19. p. 423.

Wehmer, I. Das Calciumoxalat der oberirdischen Teile von Crataegus Oxyacantha L. im Herbst und im Frühjahr. Ber. d. D. botan. Gesellsch. 1889. p. 216.

Weiss, Adolf, J. und Julius Wiesner, I. Vorläufige Notiz über die direkte Nachweisung des Eisens in den Zellen der Pflanzen. Sitzungsber. d. Wiener Ak. der Wiss. Math.-naturw. Kl. 1860. Bd. XL. p. 276.

Went, F. A. F. C., I. Die Vermehrung der Vakuolen durch Teilung. Pringsheim's Jahrbücher. Bd. XIX. p. 295.

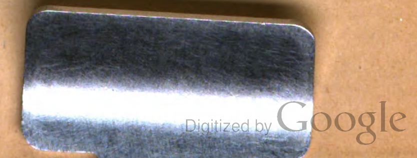
de Wèvre, A., I. Localisation de l'atropine. Bull. Soc. Belge de Microsc. T. XIII. 1887. p. 19. (Ref.: Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. V. p. 119).

Wiesner, I. Beobachtungen über die Wachsüberzüge der Epidermis. Botan. Zeitung. 1871. p. 769.
— II. Ueber die krystallinische Beschaffenheit der geformten Wachsüberzüge pflanzlicher Oberhäute. Ib. 1876. p. 225.
— III. Note über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandter Körper zur verholzten Zellmembran. Sitzungsber. d. Ak. d. W. zu Wien. Math.-naturw. Kl. Bd. 77. Abt. 1. 1878. p. 60.
— IV. Ueber das Gummiferment, ein neues diastatisches Enzym, welches die Gummi- und Schleimmetamorphose in der Pflanze bedingt. Ib. 1885. Bd. 92. Abt. I. p. 41.
— V. Untersuchungen über die Organisation der vegetabilischen Zellhaut. Ib. 1886. Bd. 93 Abt. I. p. 17.
Winogradsky, Sergius, I. Ueber Schwefelbakterien. Bot. Zeitg. 1887. p. 489.
— II. Ueber Eisenbakterien. Ib. 1888. p. 261.
Wothtschall, E., Ueber die mikrochemischen Reaktionen des Solanin. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. V. p. 19.
Zacharias, E., I. Ueber Eiweiss, Nukleïn und Plastin. Botan. Zeitung. 1883. p. 209.
— II. Beiträge zur Kenntnis des Zellkernes und der Sexualzellen. Ib. 1887. Nr. 18 bis 24.
— III. Ueber die Zellen der Cyanophyceen. Ib. 1890. Nr. 1—5.
— IV. Ueber das Wachstum der Zellhaut bei Wurzelhaaren. Flora. 1891. p. 467.
Zimmermann, I. Die Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. Breslau 1887.
— II. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. Heft I. Tübingen 1890.
— III. Idem. Heft II. 1891.
— IV. Eine einfache Methode zur Sichtbarmachung des Torus der Hoftüpfel. Zeitschrift f. w. Mikroskopie. Bd. IV. p. 216.
— V. Botanische Tinktionsmethoden. Zeitschr. f. w. Mikroskopie. Bd. VII. p. 1.
Zopf, I. Die Pilztiere oder Schleimpilze. Schenk's Handbuch. Bd III. Hälfte 2. p. 1.
— II. Die Pilze. Ibid. Bd. IV. p. 217.
— III. Ueber einen neuen Inhaltskörper in pflanzlichen Zellen. Ber. d. D. bot. Gesellschaft 1887. p. 275.
— IV. Ueber das mikrochemische Verhalten von Fettfarbstoffen und Fettfarbstoff-haltigen Organen. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. VI. p. 172.
— V. Ueber Pilzfarbstoffe. Bot. Zeitg. 1889. p. 53.
— VI. Zur physiologischen Deutung der Fumariaceen-Behälter. Ber. d. D. bot. Gesellsch. 1891. p. 107.
Zwaardemacker, H., I. Flemming's Safraninfärbung unter Hinzuziehung einer Beize. Zeitschrift f. w. Mikroskopie. Bd. IV. p. 212.



Register.

Die Verweisungszahlen des Registers beziehen sich auf die Paragraphen.


Digitized by Google

